

Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Endocrinologia

Scuola di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche

XXII Ciclo



Nuovi farmaci per la terapia del diabete mellito: oltre gli effetti ipoglicemizzanti.

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Gianni Forti

Candidata

Dr. Cristiana Deledda

Tutor

Chiar.mo Prof. Alessandro Peri

A Tommaso

SOMMARIO

| | |
|--|--------|
| INTRODUZIONE | pag 5 |
| Il Diabete Mellito | pag 5 |
| Tipo I | pag 5 |
| Tipo II | pag 5 |
| Gestazionale | pag 5 |
| Il Diabete Mellito di tipo II (DMT2) | pag 6 |
| Inibitori dell' α Glicosidasi | pag 8 |
| Biguanidi | pag 9 |
| Secretagoghi dell'insulina | pag 10 |
| Insulinosensibilizzanti (tiazolidinedioni) | pag 11 |
| Incretino-mimetici | pag 13 |
| Oltre gli effetti ipoglicemizzanti: tiazolidinedioni ed osso, incretino-mimetici e SNC | pag 15 |
| Effetti degli incretino-mimetici sul Sistema Nervoso | pag 15 |
| Effetti dei TZD sull'osso: DMT2 e densità ossea | pag 17 |
| Effetti dei TZD sull'osso:PPAR γ e densità ossea | pag 18 |
| Effetti dei TZD sull'osso:TZD e densità ossea | pag 19 |
| SCOPO DEL LAVORO | pag 24 |
| MATERIALI E METODI | pag 26 |
| Cellule e trattamenti | pag 26 |
| Differenziazione delle hMSC | pag 27 |
| Colorazioni Alizarin Red ed Oil Red O per hMSC | pag 28 |
| Estrazione dell'RNA totale e delle proteine totali | pag 28 |
| Retrotrascrizione | pag 29 |
| Real-time RT PCR e determinazione del cAMP intracellulare | pag 29 |
| Determinazione del cAMP intracellulare | pag 30 |
| Test di vitalità (Trypan blue dye exclusion ed MTS) | pag 31 |
| Microscopia ad immunofluorescenza | pag 32 |
| Apoptosi | pag 33 |
| Western blot | pag 34 |

| | |
|--|------------|
| Analisi elettrofisiologica | pag 34 |
| Analisi statistica | pag 36 |
| RISULTATI | pag 37 |
| Le cellule SH-SY5Y esprimono il recettore del GLP-1 funzionale | pag 37 |
| EXE induce cambiamenti morfologici in cellule SH-SY5Y | pag 37 |
| Analisi del citoscheletro di actina e tubulina | pag 40 |
| Western Blot per cofilina | pag 42 |
| Effetti di EXE ed RA sulle proprietà passive di membrana delle cellule SH-SY5Y | pag 43 |
| Effetti di EXE e RA sulla densità di Stretch-activated channels, I_{SAC}/C_m in cellule SH-SY5Y | pag 43 |
| Effetti di EXE ed RA sulle proprietà elettrofisiologiche dei canali ionici voltaggio-dipendenti in cellule SH-SY5Y | pag 45 |
| EXE impedisce l'apoptosi cellulare indotta da H_2O_2 | pag 49 |
| Effetti del RGZ sull'osteoblastogenesi | pag 51 |
| Effetto del RGZ sul differenziamento in senso adipocitario ed osteoblastico delle cellule hMSC | pag 51 |
| Effetto del RGZ sull'espressione di geni tipici del differenziamento adipocitario ed osteoblastico | pag 52 |
| Livello basale dell'espressione di AR ed ER nelle hMSC | pag 53 |
| Effetto di estrogeni, androgeni e fitoestrogeni sull'adipogenesi | pag 53 |
| Effetto di estrogeni, androgeni e fitoestrogeni sull'osteoblastogenesi | pag 56 |
| DISCUSSIONE | pag 58 |
| BIBLIOGRAFIA | pag 67 |

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito

Il diabete mellito è una condizione in cui l'organismo non produce a sufficienza l'ormone pancreatico insulina o non risponde propriamente ad esso (Rother 2007, Tierney 2002). Si distinguono diversi tipi di diabete (Tierney, 2002):

Tipo 1 (DMT1): deriva dall'incapacità dell'organismo di produrre insulina e prevede terapia sostitutiva con insulina ricombinante;

Tipo 2 (DMT2): risulta dalla resistenza insulinica, una condizione in cui le cellule non sono in grado di utilizzare l'insulina in modo appropriato; può essere in alcuni casi combinata ad una deficienza relativa di insulina. Molti soggetti destinati a sviluppare il DM trascorrono molti anni in uno stato di pre-diabete: questa condizione si verifica quando i livelli di glucosio nel sangue di un soggetto sono alterati ma non ancora sufficienti per una diagnosi di DMT2;

Gestazionale: le donne in gravidanza che non hanno avuto diagnosi di DM in precedenza ma che presentano livelli elevati di glucosio nel sangue durante la gestazione presentano diabete gestazionale. Questa forma di diabete affligge circa il 4% delle donne incinte. Può precedere lo sviluppo del tipo 2 (o raramente del tipo 1); generalmente si risolve dopo il parto.

Molte altre forme di diabete mellito sono classificate separatamente. Alcuni esempi includono il diabete congenito dovuto a difetti genetici della secrezione di

insulina, il diabete collegato alla fibrosi cistica, il diabete steroideo indotto da elevati livelli di glucocorticoidi, e diverse forme di diabete monogenico.

Tutte le forme di diabete sono diventate trattabili dal momento in cui l'insulina è stata disponibile nel 1921 ma non c'è cura definitiva eccetto il trapianto di pancreas o di insule pancreatiche. La patologia diabetica può presentare numerose complicazioni; complicazioni acute che includono l'ipoglicemia, la chetoacidosi diabetica o il coma iperosmolare non chetoacidotico, le quali possono verificarsi se la malattia non è controllata in modo adeguato. Complicazioni a lungo termine di grave entità includono malattie cardiovascolari, insufficienza renale, retinopatia che può causare cecità, diversi tipi di neuropatia, e danno microvascolare, da cui può derivare ad esempio disfunzione erettile e difficoltà nella guarigione delle ferite. Quest'ultima complicazione, in particolare alle estremità inferiori, può portare alla gangrena, che talora richiede l'amputazione. Il trattamento adeguato del diabete, come anche l'aumentata attenzione al controllo della pressione del sangue e dello stile di vita possono ridurre il rischio della maggior parte delle complicazioni croniche. Nel mondo industrializzato il diabete è la causa principale di cecità e di amputazione non traumatica nei soggetti adulti.

Il Diabete Mellito di tipo 2 (DMT2)

Il DMT2 è un disordine metabolico complesso che risulta da una relativa riduzione della secrezione pancreatica di insulina e da un contributo variabile della ridotta attività insulinica, o insulinoresistenza, nei tessuti target, principalmente fegato e muscolo (Ferrannini 1998, Lillioja 1993). La resistenza insulinica è stata dimostrata per la prima volta nel muscolo scheletrico, in cui

erano necessarie concentrazioni più elevate di insulina per consentire l'ingresso di glucosio nelle cellule. La resistenza insulinica periferica predice lo sviluppo del DMT2 (Lillioja 1993, Weyer 2000) e viene rilevata nei parenti normoglicemici di primo grado di pazienti di DMT2 (Perseghin 1997, Ishikawa 1998, Ishikawa M 1999); è influenzata da fattori sia genetici che ambientali. Gli individui insulino-resistenti mostrano frequentemente un insieme di altre caratteristiche, che includono obesità viscerale, dislipidemia, ipertensione, iperinsulinemia, alterata fibrinolisi, disfunzioni endoteliale, iperuricemia, infiammazioni vascolari, ed aterosclerosi prematura (Stern 1999). Questi soggetti si definiscono affetti da sindrome metabolica (Fagan 1998) o sindrome da insulinoresistenza, per enfatizzare il presunto ruolo patogenico centrale della resistenza insulinica. Inizialmente, per affrontare la resistenza insulinica, l'incremento compensatorio della secrezione di insulina pancreatica è in grado di mantenere le normali concentrazioni di glucosio. Tuttavia, con il progredire della patologia, la produzione di insulina gradualmente si riduce, portando a stadi progressivi di iperglicemia. Questa si presenta inizialmente in fase postprandiale, dal momento che l'uptake del muscolo scheletrico è il destino metabolico della maggior parte dei carboidrati ingeriti, e successivamente durante il digiuno. Se la secrezione di insulina si riduce, la produzione epatica di glucosio, normalmente attenuata dall'insulina, aumenta. Questo incremento è il principale responsabile dell'aumento dei livelli di glucosio a digiuno nei pazienti con DMT2. Su questi meccanismi si instaura il ben noto effetto deleterio dell'iperglicemia stessa, la glucotossicità (Yki-Jarvinen 1997). Il tessuto adiposo gioca un ruolo importante nella patogenesi del DMT2; la resistenza insulinica è stata dimostrata anche a livello adipocitario, dove porta ad una lipolisi incontrollata e all'incremento degli acidi grassi liberi circolanti. Questo incremento riduce ulteriormente la risposta all'insulina nel muscolo scheletrico (Randle 1963, Roden 1996) mentre altera la

secrezione insulinica del pancreas ed aumenta la produzione epatica di glucosio (lipotossicità) (Bergman 2000). Di conseguenza il DMT2 risulta da difetti coesistenti in molteplici siti: la resistenza all'azione dell'insulina nel muscolo, la ridotta secrezione pancreatica di insulina, e l'incontrollata produzione epatica di glucosio, peggiorati da una azione deficitaria dell'insulina nel grasso. Queste lesioni patofisiologiche sono responsabili dello sviluppo e della progressione dell'iperglicemia, e sono anche i target principali per la terapia farmacologica.

Il DMT2 è una patologia cronica che prevede una progressiva riduzione del controllo glicemico dovuta alla continua perdita di funzionalità β -cellulare. La monoterapia per questo tipo di patologia può di conseguenza non essere sufficiente per mantenere il controllo glicemico nel tempo. La terapia combinata risulta invece rallentare l'abbassamento del controllo glicemico rispetto alla monoterapia (Rosenstock 2006) e ridurre le complicanze della malattia. I farmaci utilizzati nella terapia si suddividono nelle seguenti classi:

Inibitori dell' α glicosidasi

Questi farmaci, tra cui Acarbosio e Miglitolo, non hanno come target uno specifico aspetto patofisiologico del diabete ma inibiscono competitivamente gli enzimi nell'orletto dell'intestino tenue e sono responsabili della digestione degli oligosaccaridi e dei disaccaridi in monosaccaridi adatti all'assorbimento (Lebovitz 1996). Essi funzionano principalmente sull' α glicosidasi, che si trova prevalentemente nella metà prossimale dell'intestino tenue. L'assorbimento intestinale dei carboidrati viene di conseguenza ritardato e spostato a zone più distali dell'intestino tenue e del colon. Questo ritarda l'ingresso di glucosio nella circolazione sistemica ed abbassa i livelli di glucosio postprandiale. Gli inibitori dell' α glicosidasi agiscono localmente sul bordo dell'orletto intestinale e non vengono assorbiti; vengono poi escreti con le feci.

Biguanidi

L'unico ancora in commercio è la metformina; tutti gli altri sono stati ritirati dal mercato internazionale negli anni '70 a causa di un aumentato rischio di acidosi lattica (Bailey 1996). I meccanismi con cui la metformina induce i suoi effetti ipoglicemizzanti non sono ancora completamente chiari. La sua funzione principale nei pazienti diabetici è la riduzione dell'emissione in circolo di glucosio epatico, principalmente attraverso la riduzione della gluconeogenesi, ma può anche, in modo meno evidente, aumentare l'uptake di glucosio da parte del muscolo scheletrico (Kirpichnikov 2002). Nel 2001, Zhou e colleghi hanno dimostrato che la metformina attiva la "adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)" intestinale e muscolare, l'enzima normalmente attivato dall'adenosina monofosfato, prodotta dalla degradazione di adenosina trifosfato e segnale cellulare per aumentate richieste energetiche (Zhou 2001). L'attivazione dell'AMPK epatica determina fosforilazione ed inibizione dell'acetilcoenzima A carbossilasi, che catalizza lo step limitante della lipogenesi. Questo blocco della sintesi di acidi grassi promuove la loro ossidazione. Inoltre l'attivazione della AMPK epatica riduce l'espressione della "sterol-regulatory-element-binding-protein-1" (SREBP-1), un fattore di trascrizione implicato nella patogenesi di resistenza insulinica, dislipidemia e diabete. La ridotta espressione di questa proteina determina ridotta espressione genica di enzimi lipogenici, che contribuiscono ulteriormente alla ridotta sintesi di trigliceridi ed alla steatosi epatica. L'attivazione della AMPK sembra uno step critico nella riduzione mediata dalla metformina della produzione di glucosio epatica e dell'aumento dell'uptake muscolare di glucosio. Di conseguenza, l'AMPK è il maggior regolatore del metabolismo dei lipidi e del glucosio e probabilmente il mediatore chiave di tutti gli effetti benefici della metformina. Altri effetti, quali l'aumentata

espressione della esokinasi muscolare e del trasportatore del glucosio insulino-sensibile, potrebbero essere fenomeni secondari (Holmes 1999). La metformina non si lega alle proteine ed è distribuita ampiamente, con un accumulo massimo nelle pareti dell'intestino tenue. Viene secreta, non modificata, dai reni.

Secretagoghi dell'insulina

Possono essere divisi in due sottoclassi: Sulfaniluree e non-sulfaniluree. Le sulfaniluree, tra cui ad esempio gliburide, gliclazide e glimepiride, si legano alla superficie delle cellule β pancreatiche mediante recettori strettamente legati alle subunità di un canale al potassio ATP-sensibile. Il legame della sulfanilurea al proprio recettore determina la chiusura dei canali al potassio e l'inibizione dell'efflusso di ioni K^+ dalla β cellula a riposo. Questo determina la depolarizzazione della membrana cellulare e, di conseguenza, l'apertura dei canali al calcio voltaggio dipendenti. L'influsso di calcio causa la contrazione dei microtubuli e l'esocitosi dell'insulina dalle vescicole. Le sulfaniluree non influenzano direttamente la sensibilità all'insulina; l'aumento della sensibilità all'insulina che si osserva dopo il trattamento con questi farmaci è secondario ad un migliorato controllo metabolico. Queste molecole sono metabolizzate prevalentemente dal fegato e filtrate dai reni. Numerosi metaboliti della gliburide sono parzialmente attivi, quindi se la clearance renale è alterata, i metaboliti accumulati possono avere un effetto ipoglicemizzante significativo. Di contro, la glimepiride e gliclazide sono metabolizzati dal fegato a metaboliti inattivi. Non-sulfaniluree: Ad esempio repaglinide. Il meccanismo di azione di questi farmaci è simile a quello delle sulfaniluree (chiusura dei canali al potassio adenosina-trifosfato sensibili, che portano alla secrezione insulinica calcio-dipendente). Tuttavia, queste molecole si legano ai recettori delle sulfaniluree in un diverso sito e con cinetiche differenti rispetto alle sulfaniluree stesse. Di conseguenza

l'azione è più rapida e l'emivita più breve, il che determina una breve stimolazione del rilascio insulinico (Hatorpe 2002, McLeod 2004). Questi composti sono metabolizzati nel fegato attraverso il sistema del citocromo P450 in prodotti biliari inattivi.

Insulinosensibilizzanti (tiazolidinedioni)

I due tiazolidinedioni (TZD) attualmente disponibili sono rosiglitazone e pioglitazone. Il troglitazone, un tiazolidinedione di più vecchia generazione, è stato ritirato dal mercato a causa di un rischio inaccettabile di insufficienza epatica fulminante. I tiazolidinedioni funzionano come ligandi del “peroxisome proliferator-activated receptor gamma” (PPAR γ) espresso principalmente negli adipociti. Questi recettori nucleari, che sono fattori di trascrizione ligando-attivati, giocano un ruolo integrante nella regolazione dell'espressione di una varietà di geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e di lipidi. I tiazolidinedioni aumentano la sensibilità insulinica, particolarmente nei tessuti periferici. Anche se non è stato dimostrato, quest'attività sembra essere mediata principalmente attraverso un effetto sugli adipociti, dal momento che nel tessuto muscolare i recettori del PPAR γ sono meno espressi. Negli adipociti viene incrementata la differenziazione, ridotta la lipolisi, ed i livelli di adipochine circolanti sono alterati; principalmente si verifica una riduzione di “tumour necrosis factor- α ” (TNF α) e leptina, e un aumento di adiponectina (Aldhahi 2003). Il reclutamento di un numero maggiore di piccoli adipociti è associato con aumentata lipogenesi ed immagazzinamento, e risulta in una riduzione di acidi grassi liberi circolanti. Tutti questi effetti -ridotto TNF α e livelli di acidi grassi liberi e aumentati livelli di adiponectina- incrementano la sensibilità insulinica (Aldhahi 2003). In modelli animali è stato anche dimostrato che i tiazolidinedioni

migliorano e preservano la funzione β cellulare pancreatica (Lister 1999, Finegood 2001).

Questa classe di molecole presenta effetti pleiotropici in numerosi distretti dell'organismo; è stato dimostrato infatti che i TZD provocano aumento del peso corporeo, riducono la pressione sanguigna, hanno effetti protettivi sulla funzionalità renale, modulano i processi infiammatori, aterotrombotici e coagulativi (Rizos 2008). Inoltre, essi migliorano il quadro clinico di pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico, e dati preliminari suggeriscono che possano indurre un miglioramento delle funzioni cognitive nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer (Rizos 2008). Esistono poi numerose evidenze a supporto delle proprietà antineoplastiche di questa classe di farmaci. L'attivazione di PPAR γ provoca l'arresto in fase G1 del ciclo cellulare in cellule neoplastiche di colon, mammella, pancreas, fegato, rene e polmone (Galli 2006), ha effetti pro-apoptotici in cellule di carcinoma mammario e di glioma, e stimola il differenziamento cellulare di cellule neoplastiche pancreatiche, mammarie e polmonari (Galli 2006). Infine, il trattamento con molecole agoniste di PPAR γ ha dimostrato effetti antiangiogenetici e di inibizione del potenziale metastatico in numerosi tipi di tumore aggressivo (Galli 2006).

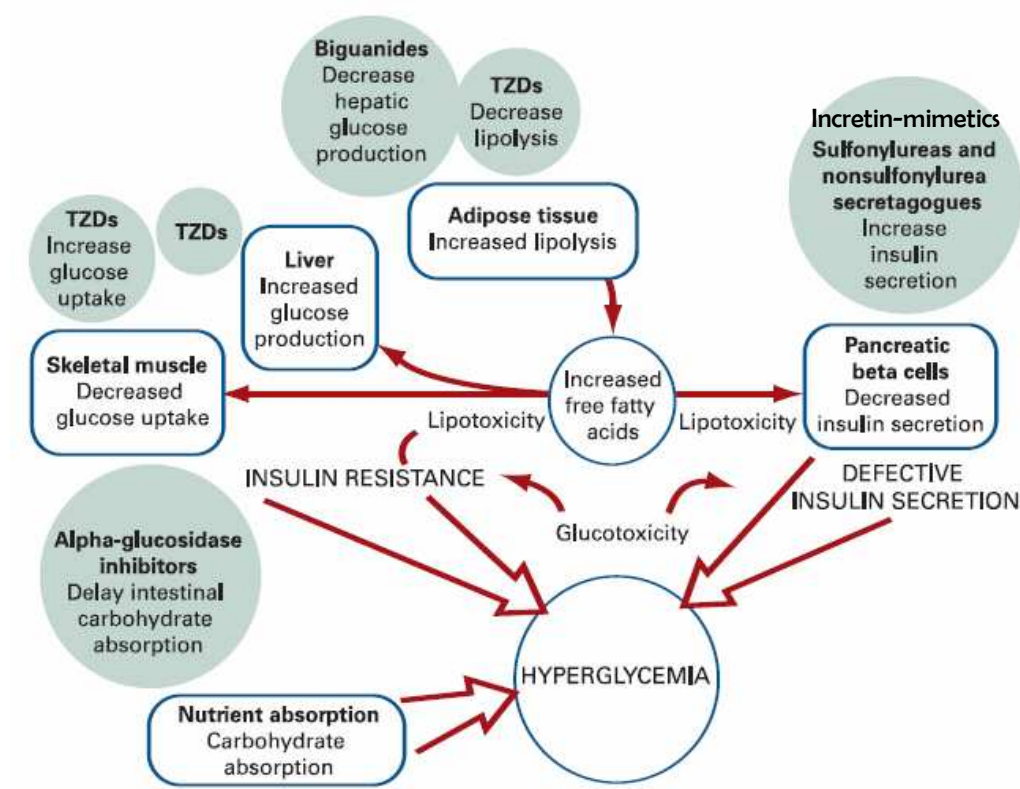


Figura I Basi fisiopatologiche delle terapie antidiabetiche convenzionali, da Triplitt 2007, modificata.

Incretino-mimetici

I due principali ormoni incretinici sono “glucagon-like peptide-1” (GLP-1) e “glucose-dependent inhibitory peptide” (GIP). GLP-1, insieme a GLP-2, è prodotto dal cleavage post-traduzionale del gene del *proglucagone* ad opera della proormone convertasi PC1/3 (Ugleholdt 2004) prevalentemente dalle cellule L dell'intestino localizzate nel colon ascendente, e secreto nel torrente circolatorio in risposta all'ingestione di cibo (Jang 2007). Mentre il GLP-2 non ha azione incretinica, il GLP-1 è il secondo peptide ad azione incretinica che stimola potentemente la secrezione d'insulina glucosio-dipendente dopo il GIP (Schmidt 1985). L'effetto incretinico consiste nella maggiore secrezione insulinica che si verifica in risposta al glucosio somministrato per via orale rispetto al glucosio iniettato nel circolo venoso (Holst 2004). Questo effetto aiuta a regolare i livelli di glucosio postprandiali ed è responsabile del 60% della secrezione insulinica in seguito all'ingestione di glucosio (Holst 2004). Dal momento che l'attività

insulinotropica di GLP-1, ma non del GIP, è preservata nei pazienti con DMT2, il GLP-1 è stato considerato una potenziale terapia per questi pazienti (Nauck 1993). Il GLP-1 inoltre è un ormone multifunzionale che inibisce la secrezione di glucagone, rallenta lo svuotamento gastrico e funziona come regolatore della sazietà (Zander 2002, Drucker 2006). Studi sperimentali *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che esso promuove la proliferazione e la funzione β cellulare, induce neogenesi delle insule pancreatiche e riduce l'apoptosi (Dachicourt 1997, Farilla 2002). Nonostante i possibili effetti proliferativi ed anti-apoptotici dell'ormone sulle β cellule, il suo potenziale terapeutico è limitato dalla sua breve emivita (circa 2 minuti), poiché esso viene rapidamente degradato dalla proteasi endogena dipeptidil-peptidasi 4 (DPP4) (Kieffer 1995, Deacon 1995). Pertanto in clinica vengono utilizzate molecole incretino-mimetiche, peptidi che mimano numerose azioni glucoregatorie del GLP-1 ma sono resistenti all'azione della DPP4 (exenatide), oppure inibitori dell'enzima DPP4 che aumentano i livelli di GLP-1 circolante (sitagliptina e vildagliptina) (Tabella 1) (Deacon 2004).

| Characteristic of type 2 diabetes | Biological action of antidiabetes agent | Incretin mimetics | DPP-4 inhibitors |
|---|---|-------------------|------------------|
| Defective glucose-stimulated insulin secretion | Increases glucose-dependent insulin secretion | Yes | Yes |
| Inappropriately elevated hepatic glucose production | Decreases hepatic glucose production | Yes | Yes |
| Hyperglucagonemia | Suppresses inappropriately elevated postprandial glucagon secretion | Yes | Yes |
| Accelerated gastric emptying | Slows gastric emptying | Yes | Marginal |
| Increased food intake | Decreases food intake | Yes | No |
| Lack of biphasic secretory response | Restores biphasic insulin secretory response | Yes | Unknown |
| Reduced pancreatic beta-cell mass and insulin content | Increases beta-cell mass and improves beta-cell function (reported in animal studies) | Yes | Yes |
| Reduced insulin sensitivity | Enhances insulin sensitivity | No | No |
| Obesity | Weight reduction | Yes | No |

Tabella 1 Meccanismi d'azione degli incretino-mimetici e degli inibitori della DPP4, da Davidson 2008, modificata.

Exendin-4 (EXE) è un peptide di 39 aminoacidi prodotto dalle ghiandole salivari del rettile Gila Monster (*Heloderma Suspectum*) (Eng 1992) che presenta il 53% di

omologia con il GLP-1 full length (Figura II); essendo priva sito di taglio per la DPP4 ha un'emivita molto maggiore di quella del GLP-1 ed inoltre si lega al recettore del GLP-1 (GLP-1R) con maggiore affinità (Thorens 1993). Exenatide è la forma sintetica di EXE, ed è stata approvata dalla Food and Drug Administration nel 2005 per la terapia del DMT2 in aggiunta a metformina, ad una sulfanilurea o ad un TZD.

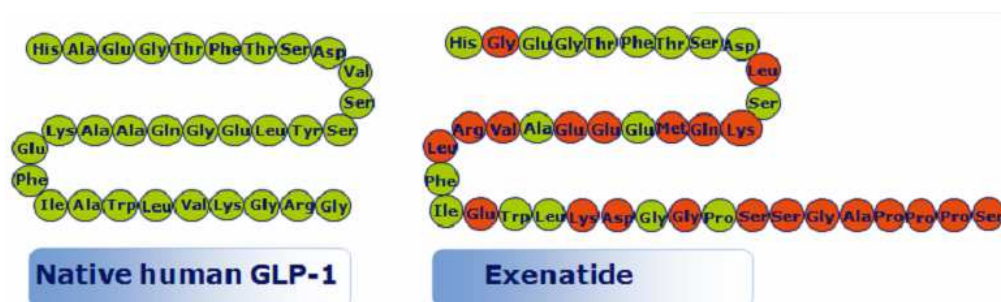


Figura II. Sequenza del GLP-1 umano e dell'exenatide, forma sintetica della molecola EXE, da Neumiller 2009, modificata.

Oltre gli effetti ipoglicemizzanti: tiazolidinedioni ed osso, incretino-mimetici e SNC

Effetti degli incretino-mimetici sul sistema nervoso

GLP-1 ed EXE legano e attivano il GLP-1R, un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a G proteins, che aumenta i livelli intracellulari di cAMP attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclasi (Thorens 1992, Usdin 1993, Moens 1996). I recettori sono localizzati in vari tessuti tra cui cuore, reni, polmoni (Ahren 2004) e nel cervello, dove sono piuttosto abbondanti nei nuclei paraventricolari ed arcuato, e nell'ipotalamo, che sono regioni chiave del cervello coinvolte nel controllo del comportamento alimentare (Goke 1995). Il GLP-1 è una molecola di dimensioni piuttosto ridotte e in grado di superare la barriera

ematoencefalica (Orskov 1996), ma è anche prodotto a livello centrale da neuroni del nucleo del tratto solitario (NTS), e del tronco encefalico (Jin, 1988).

Studi condotti in roditori indicano che i GLP-1R agonisti riducono l'assunzione di cibo a breve termine dopo iniezione periferica o nel sistema nervoso centrale (CNS), e ripetute iniezioni inibiscono significativamente l'assunzione di cibo e l'aumento di peso (Tang-Christensen 1996, Turton 1996, Meeran 1999, Baggio 2004, Abbott 2005), il che implica che sia il GLP-1 periferico prodotto dalle cellule L che il GLP-1 centrale prodotto da neuroni del nucleo del tratto solitario (NTS), e del tronco encefalico (Jin, 1988) regolano l'assunzione di cibo e peso corporeo. Questi effetti del GLP-1 sono stati osservati nei soggetti magri ed obesi così come nei pazienti diabetici (Näslund 1999, Zander 2002). Al contrario, l'antagonista del GLP-1R, l' Ex-9-39, inibisce l'effetto di GLP-1 (Turton et al., 1996; Meeran et al., 1999) e la somministrazione di EXE non ha alcun effetto in topi GLP-1R (-/-) (Baggio 2004). Inoltre talamo, tronco encefalico, setto laterale, organo subfornicale, area postrema, corteccia cerebrale, cervelletto, putamen, nucleo caudato e ippocampo esprimono il GLP-1R, suggerendo così che il GLP-1 potrebbe avere ulteriori effetti nel sistema nervoso centrale (Wei 1995, Perry 2002). Infatti i topi GLP-1R-knock-out presentano ad esempio una diminuita capacità di apprendimento e sono più sensibili alle convulsioni indotte da acido kainico ed alla degenerazione ippocampale rispetto ai topi wild type (During 2003). Effetti neuroprotettivi di GLP-1 e EXE sono stati analizzati in numerosi studi. In neuroni ippocampali di ratto in coltura esprimenti GLP-1R funzionali, GLP-1 e EXE proteggono efficacemente contro la morte cellulare glutammato-indotta (Perry 2002) e contro l'apoptosi indotta da A β e ferro (Perry 2003). Un altro studio ha dimostrato che la somministrazione di EXE riduce i danni al cervello e migliora i risultati funzionali in un modello di occlusione transitoria dell'arteria media cerebrale. Nello stesso studio si è anche mostrato che il

trattamento con EXE protegge contro la degenerazione dei neuroni dopaminergici, mantiene i livelli di dopamina e migliora la funzionalità motoria in un modello murino di malattia di Parkinson (Li 2009). GLP-1 and EXE mantengono l'integrità morfologica dei neuroni del giro dentato dell'ippocampo e migliorano le performance motorie in un modello murino di neuropatia periferica indotta da piridossina (Perry 2007), ed il GLP-1 riduce la degenerazione neuronale e la morte cellulare indotta dalla deprivazione di Nerve Growth Factor (NGF) in colture cellulari di cellule di feocromocitoma di ratto (PC12) attraverso la soppressione dell'attivazione del gene antiapoptotico Bim (Biswas 2008).

L'evidenza del ruolo neurotrofico di GLP-1R agonisti è stata ulteriormente sostenuta dalla dimostrazione di un effetto differenziante di GLP-1 e EXE sulle cellule PC12. In questo modello, entrambe le molecole sono in grado di indurre la crescita dei neuriti e l'espressione di marcatori neuronali simili a quelli indotti dal Nerve Growth Factor (Perry 2002). Nonostante i dati incoraggianti ottenuti sia *in vivo* che *in vitro* su modelli animali, fino ad oggi nessuno studio ha valutato attentamente l'attività degli agonisti del GLP-1R sulle cellule neuronali umane.

Effetti dei TZD sull'osso: DMT2 e densità ossea

Recenti studi epidemiologici hanno suggerito che la fragilità ossea è aumentata nel DMT2, nonostante l' aumento del peso corporeo e la densità minerale ossea normale o superiore alla media (Nicodemus 2001, Schwartz 2001, Vestergaard 2005, Ahmed 2006). Una metanalisi su questi studi ha confermato un aumento del rischio di fratture nei pazienti con T2DM, in particolare di bacino, omero prossimale e piede (Vestergaard 2007, Janghorbani 2007).

Nello studio delle fratture osteoporotiche (SOF), uno studio prospettico di epidemiologia delle fratture su donne americane in età avanzata, i partecipanti

con T2DM avevano un rischio superiore del 22% di fratture non-vertebrali rispetto ai soggetti sani (Schwartz 2001). I soggetti partecipanti al SOF con DMT2 trattati con insulina avevano una maggiore prevalenza di complicanze della malattia e un più alto rischio di fratture rispetto ai pazienti non trattati con insulina, nonostante si tenesse conto delle complicazioni legate alla malattia (Schwartz 2001). Risultati simili sono stati riportati dalla Women's Health Initiative (WHI) Observational Study in cui un aumento del rischio di fratture in diversi distretti nelle donne con DMT2 non veniva attenuato dalla normalizzazione per rischio di cadute e disabilità visiva (Bonds 2006). Nello studio WHI, i partecipanti con T2DM presentavano aumentato rischio di fratture vertebrali e non vertebrali (Bonds 2006).

Effetti dei TZD sull'osso: PPAR γ e densità ossea

I TZD sono attualmente impiegati nella terapia del DMT2 e potrebbero avere un potenziale come trattamento preventivo in adulti ed adolescenti ad alto rischio di sviluppare la patologia (Einhorn 2004, Wysowsk 2003). Essi interagiscono con i PPAR α , β , γ e δ ed hanno effetti dimostrati su numerosi tessuti quali fegato, muscolo scheletrico, tessuto adiposo, ed endotelio vascolare (Yki-Järvinen 2004). Questi effetti aspecifici del sistema dei PPAR sono verosimilmente alla base dell'azione dei TZD sull'osso. Infatti, è stato dimostrato un ruolo importante di PPAR- γ per il mantenimento dell'omeostasi ossea in diversi modelli animali di sviluppo osseo (Akune 2004, Cock 2004) o perdita ossea (Rzonca, Sottile, Soroc'eanu, 2004; Ali 2005). PPAR- γ è espresso in cellule stromali del midollo osseo (Gimble 1996), osteoblasti (Jackson 1998, Diascro 1998, Johnson 1999, Nuttall 2003, Jeon 2000) e precursori degli osteoclasti (Mbalaviele 2000, Chan 2007) e regola le sorti delle cellule staminali mesenchimali pluripotenti, che si differenziano in osteoblasti ed adipociti,

promuovendo l'adipogenesi a discapito dell'osteoblastogenesi in modelli animali. L'attivazione di PPAR γ in cellule stromali di midollo osseo aumenta infatti l'espressione di geni specifici degli adipociti e l'adipogenesi (Gimble 1996), mentre sopprime l'espressione di marcatori di differenziamento osteoblastici, come CBFA - 1/runx2, e inibisce l'induzione di un fenotipo osteoblastico (Jeon 2003, Lecka-Czernik 1999, Khan 2003).

La ridotta attività di PPAR γ in topi PPAR γ -aploinsufficienti o nei topi che portano una mutazione ipomorfica nel locus del gene del PPAR γ porta ad un' aumentata massa ossea, causata dall'incremento nell'osteoblastogenesi da parte dei progenitori presenti nel midollo, ma non dall'effetto sull'attività degli osteoblasti maturi o sulle cellule della linea osteoclastica (Akune 2004, Cock 2004). Inoltre, l'osteopenia legata all'età non si sviluppa in topi PPAR γ - aploinsufficienti (Akune 2004).

Effetti dei TZD sull'osso: TZD e densità ossea

L'attivazione di PPAR γ attraverso la somministrazione di RGZ nei roditori porta ad una significativa diminuzione della densità minerale (BMD) e del volume dell'osso, cambiandone la microarchitettura (Rzonca, Sottile, Soroc'eanu 2004; Ali 2005). La perdita d'osso osservata è stata associata ad alterazioni nella struttura e nella funzione del midollo osseo: si presentavano infatti un ridotto numero di osteoblasti ed un aumentato numero di adipociti (Rzonca, Sottile, Soroc'eanu, 2004; Ali 2005). Quest'effetto veniva riscontrato dopo trattamento con RGZ su modelli murini e su ratti ovariectomizzati, in cui si osservava un aumentato riassorbimento, ma nessun effetto si osservava su animali intatti. Tuttavia, Tornvig e colleghi (2001) hanno riportato che il trattamento con troglitazone non determinava perdita ossea nei topi.

Per quanto riguarda i dati clinici, due studi osservazionali hanno valutato gli effetti dei TZD sulla BMD. Nello studio Health ABC, un'analisi prospettica di coorte su anziani Americani (età media > 70 anni), l'uso di TZD (rosiglitazone, pioglitazone o troglitazone) era associato ad aumentata perdita ossea generale, circa 0.6-1.2% all'anno nelle donne diabetiche (Schwartz 2006). Una maggior durata del trattamento con TZD era associata a perdita ossea più rapida. Nessun effetto si osservava sulla BMD nel piccolo gruppo (n=32) di maschi diabetici esposti ai TZD nell'Health ABC. Tuttavia, uno studio osservazionale retrospettivo su uomini con DMT2 trattati con RGZ per un tempo medio di 16 mesi riportava aumenti da 3 a 6 volte di perdita ossea sia a livello della colonna dorsale che del femore prossimale rispetto al gruppo non trattato (Yaturu 2007). Una comprensione più profonda del meccanismo con cui i TZD accelerano la perdita ossea nell'uomo è stata data da recenti trial randomizzati e controllati. Questi trials hanno avuto breve durata (3-4 mesi), ed hanno valutato sia il trattamento con RGZ sia su donne sane in postmenopausa (Grey 2007) che su donne in postmenopausa con DMT2 (Berberoglu 2007). In questi studi, che valutavano gli effetti del trattamento sia con 4 che con 8 mg al giorno, il RGZ riduceva i markers biochimici di formazione ossea (propeptide N-terminale del procollagene di tipo I ed osteocalcina) del 10-20% in entrambi i gruppi (Grey 2007, Berberoglu 2007) senza cambiamenti nei markers di riassorbimento osseo, e si osservava una significativa riduzione della BMD assiale (colonna dorsale e bacino) nonostante la breve durata del trattamento (Grey 2007) (Tabella 2).

| TZD, dose [reference] | Study design | Duration | Study population | Outcome measures | Results |
|---|--|-----------------|-------------------------------|--|---|
| Rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone* [Schwartz 2006] | Prospective cohort | 4 years | T2DM | Bone density | ↑ bone loss at total body, trochanter and lumbar spine in women |
| Rosiglitazone, 8 mg [Grey 2007] | Randomized controlled trial | 14 weeks | Healthy postmenopausal women | Markers of bone turnover bone density | ↓ markers of bone formation; ↑ bone loss at total hip |
| Rosiglitazone, 4 mg [Berberoglu 2007] | Randomized controlled trial | 12 weeks | T2DM | Markers of bone turnover | ↓ marker of bone formation |
| Rosiglitazone, 8 mg (Yaturu 2007) | Retrospective observational | 16 months | Men with T2DM | Bone density | ↑ bone loss at total hip and lumbar spine |
| Pioglitazone, 30 mg [Glintborg 2008] | Randomized controlled trial | 16 weeks | Premenopausal women with PCOS | Markers of bone turnover Bone density | ↑ bone loss at femoral neck and lumbar spine |
| Rosiglitazone, pioglitazone [Meier 2008] | Case-control | Up to 18 months | T2DM | Fracture | ↑ risk of fractures, including hip, humerus and wrist |
| Rosiglitazone, 8 mg [Kahn 2006] | Randomized controlled trial, active comparators | 4 years | T2DM | Fracture | ↑ incidence of limb fractures in women |
| Pioglitazone [http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Actosmar0807.pdf] | Randomized, controlled trials, active or placebo comparators | 3.5 years | T2DM | Fracture | ↑ incidence of limb fractures in women |
| Pioglitazone, 37 mgz [Nissen 2008] | Randomized, controlled trial, active comparator | 18 months | T2DM | Fracture | ↑ incidence of fractures |

Tabella 2 Riassunto degli studi clinici sugli effetti scheletrici dei TZD, da Grey 2009, modificata.

Nella review del 2009 di Grey e colleghi sugli effetti dei TZD sulla fragilità ossea si sottolineava come, nonostante ci fossero evidenze cliniche dell'effetto negativo dei TZD sulla densità ossea e dati sperimentali sui modelli animali che

ne indagavano i meccanismi di base, non esistessero lavori sperimentali che chiarivano questi effetti sull'uomo.

A fronte delle evidenze sulla tossicità scheletrica da TZD negli umani, la compagnie farmaceutiche che distribuiscono questi farmaci hanno analizzato i dati sugli eventi avversi raccolti durante le sperimentazioni. Nell'ADOPT, un paragone randomizzato di 4 anni di rosiglitazone, metformina e gliburide sul mantenimento del controllo glicemico nel DMT2, si osservava un'incidenza di fratture significativamente più elevata sugli arti nelle donne, ma non negli uomini, trattati con RGZ (Kahn 2006). E' importante notare che non c'era controllo con placebo, ma l'evidenza disponibile suggerisce che gli altri ipoglicemizzanti orali non alterino il rischio di fratture (Monami 2008, Meier 2008). Una successiva comunicazione dalla GlaxoSmithKline indica che l'analisi preliminare di eventi avversi da uno studio in atto dimostra un aumento nell'incidenza di fratture con il RGZ, dove il pattern di fratture è simile a quello riscontrato nell'ADOPT

(http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Avandia_GSK_Ltr.pdf).

Un'analisi effettuata su diversi studi di eventi di frattura da trials randomizzati con pioglitazone, che includevano nel complesso 15000 soggetti, dimostrava un aumento di fratture agli arti nelle donne, ma non negli uomini, che ricevevano questo farmaco sia rispetto al placebo che ad altri ipoglicemizzanti (<http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Actosmar0807.pdf>).

Quest'evidenza era chiara nonostante la massima durata dell'esposizione al pioglitazone fosse di soli 3,5 anni.

Di conseguenza si può concludere che un aumentato rischio di fratture, almeno nelle donne, è un effetto della classe dei TZD. E' importante sottolineare che le fratture non erano un endpoint specifico negli studi sopra citati, per cui i dati non sono stati raccolti in modo sistematico; la valutazione delle fratture vertebrali

non era possibile e c'è stata una probabile sottostima dei dati. E' anche importante il fatto che le popolazioni studiate erano relativamente giovani, con età media 55-60 anni, ed a relativo basso rischio di fratture. Di conseguenza, le fratture riportate non erano "tipiche" fratture osteoporotiche nella maggior parte dei casi (Grey 2009). Infatti la prevalenza di fratture distali agli arti in questi studi è coerente con l'andamento delle fratture riportate in studi epidemiologici dell'incidenza di fratture in popolazioni non-diabetiche della stessa età (Sanders 1999, Garraway 1979). La conclusione clinica fondamentale è che sarebbe rischioso assumere che non ci sia aumentato rischio di "classiche" fratture osteoporotiche nei pazienti trattati con TZD, considerati i dati limitati attualmente disponibili. Un recente studio caso-controllo supporta questa ipotesi, dimostrando che pazienti con DMT2 esposti a TZD (rosiglitazone o pioglitazone) erano più soggetti a fratture del bacino, dell'omero e del polso rispetto a coloro che non ne facevano uso (odds ratio 2.4–2.5), indipendentemente dal sesso (Meier 2008).

Tra le possibili ipotesi formulate, i TZD nell'uomo potrebbero agire sull'osso attraverso l'incremento dell'adiposità del midollo e l'inibizione dell'osteoblastogenesi, con conseguente riduzione della formazione ossea (Rzonca 2004) e/o riducendo la formazione degli ormoni estrogenici influenzando la via biochimica di segnalazione dell'aromatasi e probabilmente incrementando il riassorbimento osseo (Rubin 2000).

SCOPO DEL LAVORO

Il DMT2 è una condizione patologica cronica in cui si verificano alterazioni e complicazioni importanti in numerosi distretti dell'organismo, tra cui tessuto muscolare, sistema nervoso, tessuto adiposo, apparato urinario, apparato scheletrico e tessuti endoteliali, pertanto in questa patologia è particolarmente importante tener conto degli effetti sistemici delle molecole utilizzate nella terapia.

Scopo di questo studio è stato valutare le azioni di due molecole utilizzate nella terapia del DMT2, l'incetino-mimetico EXE ed il TZD RGZ, su tessuti diversi dai loro classici target. In particolare, abbiamo studiato:

1) gli effetti di EXE sul modello di cellule neuronali umane SH-SY5Y in termini di protezione, trofismo e differenziamento neuronale. A questo scopo abbiamo valutato la formazione di prolungamenti neuritici, il rimodellamento delle strutture proteiche citoscheletriche, le modifiche delle proprietà elettrofisiologiche delle cellule e la protezione dallo stimolo apoptotico indotto da stress ossidativo, che è alla base del danno neuronale di molte patologie neurodegenerative (Luciani 2009, in valutazione alla rivista *Journal of Neurochemistry*);

2) gli effetti del RGZ sul rimodellamento osseo utilizzando un modello di cellule staminali mesenchimali umane hMSC provenienti dalla porzione stromale del midollo osseo. In questa parte del nostro lavoro abbiamo valutato le conseguenze dell'esposizione al RGZ sul differenziamento di cellule hMSC verso i lineages osteoblastico ed adipocitario, in termini di modulazione sia dell'espressione di markers lineage-specifici che delle alterazioni strutturali e funzionali dei due fenotipi maturi: la formazione di vacuoli lipidici nel caso degli adipociti, la

deposizione di matrice ossea nel caso degli osteoblasti (Benvenuti 2007, Benvenuti 2009 in preparazione).

MATERIALI E METODI

Cellule e trattamenti

Per la linea di cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) tutti i reagenti per colture cellulari sono state acquistate da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Il materiale plastico è stato acquistato da Bibby STERILIN (Staffordshire, UK). Le cellule sono state mantenute in terreno RPMI supplementato con 10% FBS, 200 mM L-glutamine, 100 unità/ml penicillina, 100 mg/ml streptomicina e mantenute at 37°C in atmosfera umidificata (5% CO₂). Per i trattamenti le cellule sono state seminate in multi-well da 6 pozzetti in condizioni di basso siero (2%) e trattate con EXE 300 nM o con acido tutto trans retinoico (RA) (Sigma, Milano, Italia) 10 µM per 24 e 48 h.

Per le cellule staminali mesenchimali umane hMSC, mezzi e sieri per colture cellulari sono stati acquistati da Euroclone (Wetherby, West York, UK) le plastiche sono state acquistate da GreinerBio-One (Frickenhausen, Germania). Altri reagenti utilizzati per le colture cellulari sono stati acquistati da Sigma; i buffer per la citometria a flusso (CellWASH) da Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). Gli anticorpi monoclonali per immunofenotipizzazione nella citometria a flusso sono stati acquistati da BD Pharmingen (San Diego, CA) e Ancell (St.N. Bayport, MN). Per l'estrazione dell'RNA il Nucleospin® RNAII kit è stato acquistato da Macherey-Nagel (Düren, Germania), i reagenti per RT-PCR Applied Biosystem Inc. (Foster City, CA). Rosiglitazone, genisteina, quercetina, 17beta-estradiolo, diidrotestosterone, testosterone, metiltrienolone (R1881) sono reagenti Sigma, risospesi secondo le istruzioni del produttore. Le (hMSC) sono state ottenute dal midollo osseo della cresta iliaca di sei volontari sani. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i donatori e il comitato etico

istituzionale ha approvato tutte le procedure. Le hMSC sono state isolate e caratterizzate come descritto in precedenza (Benvenuti 2006). Brevemente, il midollo osseo raccolto è stato suddiviso in piccole aliquote che sono state centrifugate. Il buffy-coat contenente i globuli bianchi è stato recuperato e piastrato in fiasche da 75cm² in terreno Iscove's MDM (con L-glutamina e Hepes 25 mM) con 50 µg/ml di gentamicina e 10% FBS. Le cellule sono state poi incubate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Al raggiungimento della confluenza, le cellule aderenti sono state staccate con tripsina 0,05% e 0,02% EDTA per 5-10 minuti a 37 °C, raccolte e lavate con HBSS ed FBS 10% ed infine risospese in medium completo. L'espansione cellulare è stata ottenuta da cicli successivi di tripsinizzazione e re-seeding. Al primo passaggio, una parte di cellule sono state caratterizzate al FASCAN utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali coniugati: PE-CD34, CD45-FITC, CD14-PE (al fine di quantificare la contaminazione emopoietica -monocitica) ed anticorpi specifici per markers di tipica espressione mesenchimale o staminale neuronale: PE-CD29, CD44-FITC (recettore dell'acido ialuronico), CD166-PE, PE-CD90, CD73-PE, HLA-DP QR, HLA-ABC (antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I) (Chiao 2008) (BD Pharmingen, San Diego, CA) e CD105-PE (Ancell, St.N. Bayport, MN).

Differenziazione delle hMSC

La caratteristica principale delle hMSC è quella di essere in grado di differenziare lungo i lineages osteogenico ed adipogenico come ampiamente descritto in letteratura con alcune modifiche. Le hMSC sono state quindi indotte verso il fenotipo osteoblastico mantenendole in coltura in mezzo DMEM integrato con FBS 10%, acido ascorbico 100 µM, beta-glicerofosfato 10 mM. Dopo 24 h è stato aggiunto desametasone 10 nM e le cellule sono state mantenute in coltura per 3

settimane (Pittenger 1999, modificato). Per la differenziazione adipogenica, le hMSC sono state mantenute in terreno di coltura fino a subconfluenza e quindi è stato aggiunto per 72 h il trattamento differenziante in senso adipogenico costituito da 1 μ M desametasone, metil-isobutylxantina 0.5 mM, insulina 10 μ g/ml ed indometacina 100 mM. Successivamente, quando si sono formate cellule contenenti vacuoli lipidici il medium è stato sostituito con terreno di mantenimento adipogenico, contenente insulina 10 μ g/ml.

Colorazioni Alizarin red ed Oil Red O per hMSC

Per valutare la differenziazione delle hMSC in osteoblasti le piastre di Petri sono state colorate per rilevare la componente minerale della matrice extracellulare che viene legata dall' alizarin Red-S; in seguito le hMSC sono state fotografate al microscopio ottico.

La differenziazione adipogenica è stata valutata con colorazione Oil Red O, che si lega selettivamente alle strutture lipidiche cellulari; le MSC sono state fissate in paraformaldeide al 2% e colorate con 0,3% Oil Red O. Le gocce lipidiche sono state contate in dieci campi 40X e fotografate al microscopio in campo chiaro ed in campo scuro.

Estrazione dell'RNA totale e delle proteine totali

Per estrarre l'RNA dalle cellule è stato impiegato il kit "Nucleospin RNAII" Makerey Nagel seguendone le istruzioni. Il lisato cellulare è stato trattato con DNAsi per eliminare ogni eventuale contaminazione da DNA genomico. L'RNA estratto è stato eluito in acqua bidistillata 40 μ l (RNAsi free) ed è stato quantificato allo spettrofotometro Nano Drop (NanoDrop Technologies) a 260 nm.

Per estrarre le proteine dalle cellule è stato utilizzato un buffer di lisi (costituito da Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM, Triton X-100 1%, Na₃VO₄ 1 mM, fenil-metil-sulfonilfluoruro PMSF 1 mM, leupeptina 1 µg/ml) lasciando ad incubare per 2 ore in ghiaccio. Le cellule sono state quindi fatte passare ripetutamente attraverso un ago da insulina (0.5 mM). Per determinare la concentrazione delle proteine è stata utilizzata una curva standard di albumina bovina (BSA) in un range da 1 a 15 µg. Ad un µl di lisato di ciascun campione sono stati aggiunti 500µl di reattivo di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., protein assay) diluito 1:5. L'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro a 595 nm. I risultati, ottenuti per interpolazione dei valori dell'assorbanza sulla curva standard, sono stati espressi in µg di proteine totali/µl.

Retrotrascrizione

L'RNA totale (400 ng) per la retrotrascrizione è stato estratto dalle cellule utilizzando Nucleospin ® RNAII (Macherey-Nagel Düren, Germania), ed è stato retrotrascritto in 40 microlitri di volume finale, seguendo le istruzioni del produttore. Il cDNA a singolo filamento è stato sintetizzato con "TaqMan Reverse Transcription Reagents " (Applied Biosystems) con Reaction Buffer 1X; MgCl₂ 5,5 mM; dNTPs 2 mM; RNAsi Inhibitor 1U; esameri random 1,25 µM; MuLV 2U. Il profilo della reazione di trascrizione inversa è stato di 10 min a 25 °C, 30 min a 48 °C, e 5 min a 95 °C.

Real-time RT PCR e determinazione del cAMP intracellulare

La quantificazione dell' mRNA del GLP-1R è stata eseguita in real-time RT-PCR basata sulla tecnologia TaqMan, come descritto in precedenza (Benvenuti 2006). Le sequenze di primers e sonda utilizzati per GLP-1R erano R: 5' -

GGCCAGCAGGCGTATTCA-3' F: 5 '-CCTCCTGCCACAGACTTGTTC-3'
della sonda: 5 'FAM- CAACCGGACCTTCG -3'TAMRA. Primers e sonda per:
recettori ormonali (androgen receptor AR Hs00171172_m1, estrogen receptors
ER α Hs00174860_m1 ed ER β Hs00230957_m1), marcatori di osteoblastogenesi
(Runx2 Hs00231692_m1 ed osteocalcina Hs00609452_g1) e marcatori di
adipogenesi (FABP4 Hs00609791_m1, PPAR- γ Hs00234592_m1) sono prodotti
Assay-On-Demand per l'analisi dell'espressione genica (Applied Biosystems); la
miscela di PCR (25 μ l volume finale) era composta da una concentrazione finale
1X di Assay-On-Demand mix, concentrazione finale 1X di Universal PCR
Master Mix (Applied Biosystems), e 20 ng di cDNA.

Ogni misurazione è stata effettuata in triplicato. La quantificazione dell' mRNA è
stata basata sul metodo comparativo Ct ed i dati sono stati normalizzati per
l'espressione dell'RNA ribosomiale 18S (Hs99999901_s1 Assay-On-Demand,
Applied Biosystems).

Determinazione del cAMP intracellulare

L'AMP ciclico intracellulare è stato misurato utilizzando il cAMP-direct
Immuno Assay KIT (Calbiochem) secondo le istruzioni del produttore. Le cellule
SH-SY5Y sono state trattate con 300 nM EXE in presenza di 0,5 mM
Isobutylmethylxanthine IBMX e raccolte a intervalli di 2 minuti dopo l'inizio del
trattamento per un periodo complessivo di 30 min. Le concentrazioni di cAMP
sono state calcolate su una curva standard generata utilizzando una diluizione
seriale di cAMP Standard solution fornita dal kit. Il Calbiochem® cAMP Direct
Immunoassay Kit colorimetrico fornisce una piastra 96-well a cui sono legati
anticorpi policlonali specifici per il cAMP. Nei pozzetti vengono caricati
contemporaneamente i lisati cellulari dei campioni ed una soluzione di cAMP
coniugati alla fosfatasi alcalina, che si legano agli anticorpi in modo competitivo.

Dopo una incubazione contemporanea a TA, l'eccesso di reagente viene eliminato e si aggiunge il substrato dell'enzima, che catalizza una reazione colorimetrica. Dopo un breve periodo di incubazione la reazione viene bloccata ed il segnale colorato generato viene letto da un lettore microplate a 405 nm; l'intensità del colore misurata sarà inversamente proporzionale alla quantità di cAMP presente nel campione e negli standard.

Test di vitalità (Trypan blue dye exclusion ed MTS)

La vitalità cellulare in seguito all'esposizione a 300 nM EXE e / o 20 e 50 μM H_2O_2 è stata determinata con la metodica MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3carbrossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (Promega Corporation, Madison, WI USA).

Si tratta di un metodo colorimetrico per determinare la vitalità cellulare: l'MTS, un derivato solubile di un sale di tetrazolio che è in grado di attraversare la membrana cellulare, può essere chimicamente ridotto dai sistemi enzimatici cellulari se la cellula è vitale. Tale forma ridotta è rilevabile allo spettrofotometro a 490 nm. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ($1,5 \times 10^4$ cellule per pozzetto) per 24 ore, quindi è stata aggiunta EXE 0,3 μM overnight (100 μl medium/pozzetto). Il giorno successivo le cellule sono state trattate con H_2O_2 20 o 50 μM per 3h. Alla fine dell'incubazione i pozzetti sono stati lavati 2 volte con PBS e posti in 100 μl di terreno fresco, poi sono stati aggiunti 20 μl di MTS/pozzetto e le cellule sono state incubate a 37 °C fino all'inizio del viraggio del colore. I campioni sono stati analizzati con un lettore ELISA (Saec-Radim, Moncalieri, Italia) a 490 nm di lunghezza d'onda.

L'assorbimento a 490 nm è direttamente proporzionale al numero di cellule vive. I risultati sono stati espressi in termini di media \pm ES di cellule vive per pozzetto, di tre diversi esperimenti. La vitalità cellulare è stata analizzata anche mediante “ Trypan blue dye exclusion test”. Brevemente, alle cellule coltivate in fiasche da 25 cm² è stata aggiunta EXE overnight. Il giorno successivo è stato cambiato il terreno ed aggiunta H₂O₂ 20/50 μ M per 3h; in seguito le cellule sono state trasferite in terreno fresco e colorate con Trypan blue dye per un minuto. Le cellule blu-positive e bianche-negative sono state contate in 10 campi diversi con obiettivo 20X ed i risultati sono stati espressi come media \pm ES di cellule vive e cellule morte per campo, di tre diversi esperimenti.

Microscopia ad immunofluorescenza

Dopo i trattamenti, le cellule sono state fissate per 5 minuti in acetone freddo, poi lavate in PBS. Dopo aver bloccato legami aspecifici con PBS contenente il 3% di BSA, le cellule sono state incubate overnight a 4 ° C con gli anticorpi specifici monoclonali umani anti-tubulina ed actina) (Chemicon). Le cellule sono state poi incubate con un anticorpo IgG anti-mouse coniugato con FITC (isotiocianato di fluoresceina) (Chemicon). I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo gli anticorpi primari. I campioni sono stati valutati mediante microscopio ad epifluorescenza (Nikon) a 100x ingrandimento e fotografati con fotocamera digitale CCD HiRes IV (DTA). L'analisi delle immagini è stata eseguita estraendo, per ogni immagine delle cellule, la regione di interesse (ROI) con software dedicato (Image Pro Plus). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato. Per l'analisi di immunofluorescenza, almeno 30 cellule per vetrino sono state osservate in 10 campi casuali per ogni vetrino. La valutazione semi-quantitativa della fluorescenza per la distribuzione della tubulina è stata eseguita da tre operatori diversi per almeno dieci campi.

Apoptosi

L'apoptosi è stata valutata mediante analisi TUNEL, utilizzando ApopTag® fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit acquistato da Chemicon international. Le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto e incubate in presenza o assenza di EXE 300 nM e H₂O₂ (20 e 50µM) per 3 h. I campioni sono stati trattati seguendo le istruzioni del produttore. Il metodo Tunel è una colorazione citochimica che sfrutta dei nucleotidi coniugati a digossigenina e aggiunti enzimaticamente al DNA ad opera della deoxynucleotidyl-transferase (TdT). Le nuove estremità generate dalla frammentazione del DNA sono tipicamente localizzate in nuclei identificabili morfologicamente ed in corpi apoptotici, mentre nuclei normali o proliferanti che presentano una quantità trascurabile di estremità 3'OH libere del DNA non vengono marcati. I nuclei cellulari vengono marcati con DAPI, che si lega al DNA ed emette un segnale fluorescente nel rosso. I nucleotidi trifosfato contenuti nel buffer di reazione vengono aggiunti dalla TdT all'estremità 3'OH libera dei frammenti a doppio o a singolo filamento, indipendentemente dalla loro sequenza. I nucleotidi incorporati formano un oligomero composto di nucleotidi legati alla digossigenina e nucleotidi non marcati in sequenza casuale, allo scopo di ottimizzare il legame degli anticorpi anti-digossigenina e di minimizzare l'auto-quenching della fluoresceina. I frammenti di DNA così marcati vengono riconosciuti da un anticorpo anti-digossigenina coniugato a fluoresceina, il cui segnale verde viene rilevato al microscopio a fluorescenza. I nuclei totali risulteranno quindi rossi, mentre i nuclei apoptotici saranno marcati in verde. La valutazione del numero di cellule apoptotiche è stata effettuata su almeno 10 campi per vetrino, ed i valori ottenuti sono stati espressi come percentuale di cellule apoptotiche/cellule totali ± SE di tre esperimenti.

Western blot

SDS-PAGE e Western blot sono stati eseguiti come descritto in precedenza (Luciani 2004). Brevemente, i campioni di proteine (30 μg) sono stati diluiti in uguale volume di sample buffer riducente Laemmli 2X (62,5 mM Tris, pH 6,8, contenente 10% glicerolo, 2% di sodio dodecil solfato, pironina 2,5%, e 200 ditiotreitolo mM), incubati a 95 °C per 5 minuti, e caricati su gel al 10% di poliacrilammide-bisacrilammide. Dopo la separazione in SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su nitrocellulosa (Sigma) e colorate con Ponceau per verificare di aver caricato i campioni in modo uguale. La nitrocellulosa è stata tenuta in blocking buffer contenente il 5% di latte scremato in polvere per 1h in soluzione TTBS (Tris-buffered saline contenente 0,1% Tween 20, pH 7,4), lavata, e poi trattata con anticorpi anti-fosfo-Cofilina ed anticorpi anti-Cofilina (1:1000 in blocking buffer e latte in polvere 5%) (Cell Signaling). L'intensità delle bande immunoreattive è stata quantificata mediante Quantity One Software su strumento ChemiDoc XRS (BIO-RAD Labs, Hercules, CA). Ogni gruppo è stato normalizzato rispetto al suo corrispondente segnale marcato con anticorpo anti-GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) (1:2000 in blocking buffer e latte in polvere 5%) (Sigma). I risultati sono espressi come media \pm SE di 3 esperimenti.

Analisi elettrofisiologica

Pipette da patch a bassa resistenza (3-7 $\text{M}\Omega$) fatti in vetro borosilicato (apparecchi Harvard LTD) con un puller verticale (Narishige, Tokyo, Giappone) sono stati utilizzati per le registrazioni in modalità whole-cell current- and voltage-clamp. Le pipette per la registrazione sono state riempite con una soluzione che conteneva (mM): 150 CsBr, 5 MgCl_2 , 10 EGTA e 10 HEPES pH 7,2, con KOH. I vetrini coprioggetto con le cellule aderenti (controllo neuroblasti

SY5Y ed EXE, o RA, trattati per 48h SY5Y) sono stati infusi ad una velocità di 1,8 ml min⁻¹ con un bagno di soluzione fisiologica (mM): 150 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-glucosio e 10 HEPES pH 7.4 con NaOH. Per testare l'attività dei canali Na⁺ voltaggio-attivati, abbiamo usato TTX (1 µM). Quando le correnti K⁺ verso l'esterno dovevano essere bloccate, gli esperimenti sono stati effettuati in un bagno di soluzione di TEA 20 mM contenente (mM): 122,5 NaCl, 2 CaCl₂, 20 TEA-OH e 10 HEPES. Le correnti Ca²⁺ sono state registrate in un bagno di soluzione TEA-Ca²⁺, soluzione priva di Na⁺ e K⁺, contenente (mM): 10 CaCl₂, 145 TEABr e 10 HEPES. Nifedipina (10 µM) è stata utilizzata per evitare il verificarsi di correnti Ca⁺ di tipo L (HVAC) e Cd²⁺ (0,8 mM) per bloccare tutti i canali high voltage-activated, HVACs, come correnti Ca²⁺ di tipo L ed N.

La configurazione whole-cell è stata ottenuta mediante applicazione di una moderata pressione negativa. La resistenza all'accesso è stata costantemente monitorata durante gli esperimenti. Sono state analizzate solo le cellule in cui la resistenza di accesso è rimasta stabile (alterazioni <10%), e per l'analisi è stato utilizzato il software Pclamp6 (Axon Instruments, Foster City, CA). La tecnica, le impostazioni e l'elettronica sono state descritte in dettaglio in precedenza (Benvenuti 2006, Benvenuti 2005, Formigli 2005).

La sensibilità dei canali attivati da stiramento (Stress-activated-channels, SAC) è stata valutata secondo quanto riportato da Formigli e colleghi (Formigli 2009). Per inattivare la maggior parte delle I_{Na} and I_{Ca} il potenziale di holding era di -40 mV ed è stato applicato un protocollo di impulso, lungo 100 ms, che passava da -80 a 0 mV con incrementi di 10 mV a partire da un pre-step a -60 mV. I potenziali di membrana a riposo (RMP) sono stati registrati passando alla modalità current clamp dell'amplificatore a 200 B. Gli esperimenti sono stati condotti a 22 °C.

Analisi statistica

I risultati degli esperimenti multipli sono espressi come media \pm SEM. La significatività delle differenze tra le medie è stata verificata mediante test t di Student, e sono stati considerati statisticamente significativi i valori di $p < 0,05$. Per confronti multipli è stata utilizzata l'ANOVA one-way per misure ripetute. La significatività è stata corretta attraverso il confronto multiplo delle medie secondo l'approssimazione di Bonferroni.

RISULTATI

1-EFFETTI NEUROTROFICI E NEUROPROTETTIVI DI EXE

Le cellule SH-SY5Y esprimono il recettore del GLP-1 funzionale

La presenza di GLP-1R è stata rilevata nelle cellule SH-SY5Y mediante analisi RT-PCR real-time ($C_t = 29.5 \pm 0.4$). Al fine di valutare la funzionalità del GLP-1R è stata eseguita un'analisi time-course dell'attivazione del GLP-1R. Dal momento che EXE è in grado di stimolare la adenilato ciclasi, che porta ad un aumento di cAMP intracellulare (Thorens 1992), abbiamo dosato il cAMP ad intervalli di 2 minuti dopo il trattamento con EXE 300 nM (Fig. 1). I livelli di cAMP raggiungevano il valore massimo entro 4 minuti dopo la stimolazione (Fold-increase= 5 rispetto al tempo 0). Questi risultati dimostrano la presenza di un GLP-1R funzionalmente attivo nelle cellule SH-SY5Y.

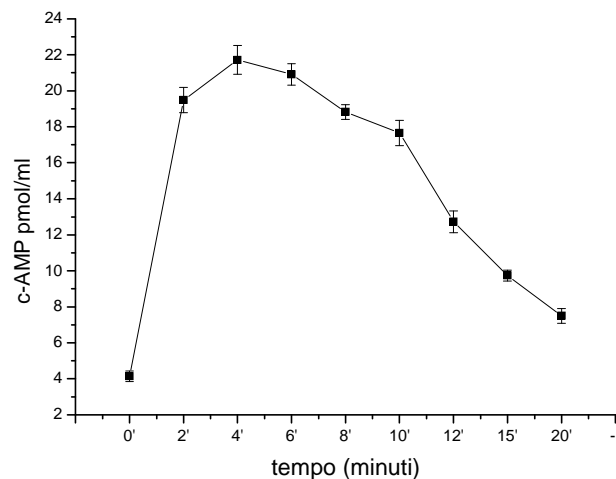


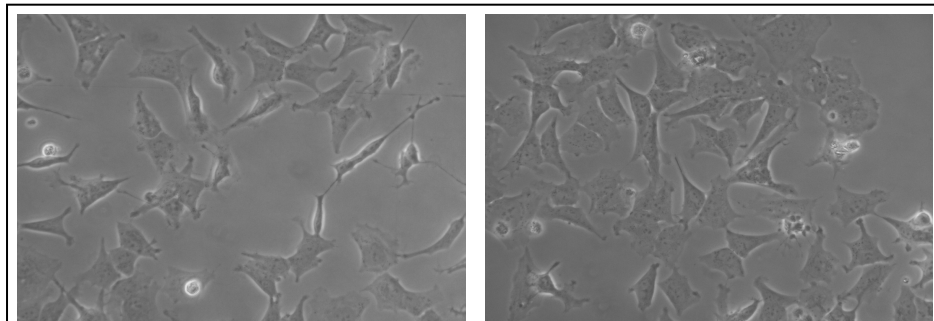
Figura 1: Determinazione del cAMP intracellulare dopo incubazione con EXE a tempi diversi.

EXE induce cambiamenti morfologici in cellule SH-SY5Y

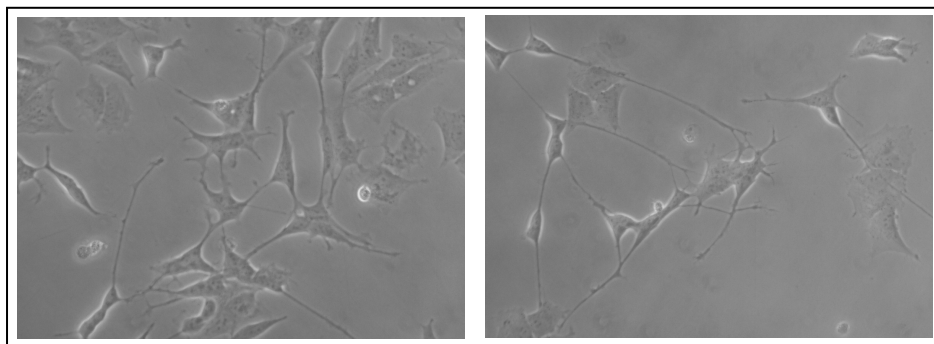
Le cellule SH-SY5Y sono state mantenute in condizioni di basse concentrazioni di siero (2%) o esposte a EXE 300nM. La figura 2 mostra un tipico esperimento in cui la crescita neuritica indotta da EXE (Fig. 2B) è stata confrontata con

quella indotta da acido retinoico (RA), il classico agente di differenziazione neuronale di queste cellule (Abemayor 1989), utilizzato come controllo (fig. 2C).

A



B



C

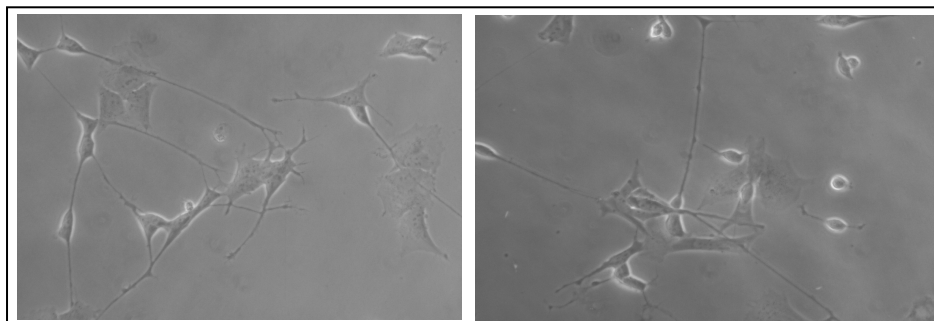


Fig 2: Foto al microscopio invertito a contrasto di fase (ingrandimento 40X) che mostrano la morfologia delle cellule SH-SY5Y prima (A) e 48 h dopo il trattamento con EXE (B) o con il controllo positivo RA (C). I pannelli di sinistra e di destra rappresentano 2 campi diversi della stessa condizione sperimentale.

E' stata effettuata una quantificazione giornaliera dello sviluppo dei neuriti. Nella Figura 3 è riportata la percentuale di cellule con neuriti dopo 24-48-72 h di trattamento. Sia il trattamento con RA che con EXE aumentavano significativamente il numero di cellule con neuriti, ma il trattamento combinato con RA ed EXE non produceva effetti additivi.

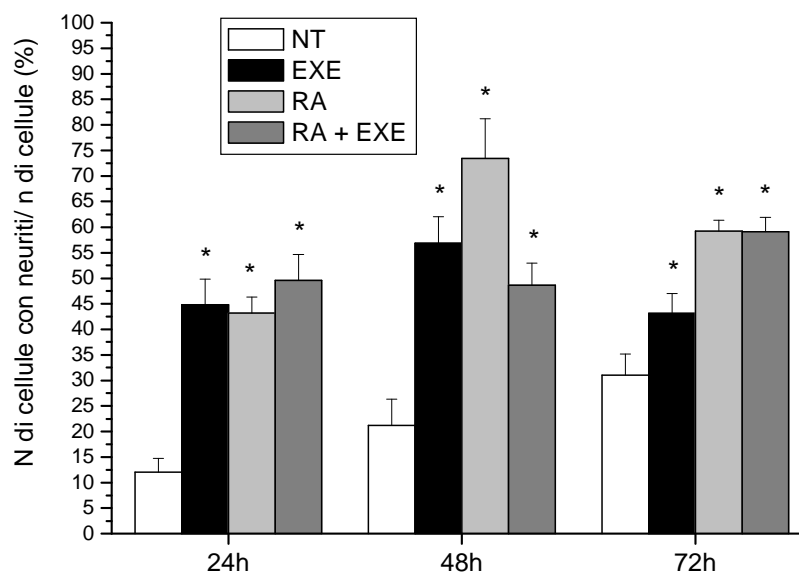


Fig 3: Analisi delle variazioni morfologiche indotte da EXE (barre nere), RA (barre grigie) o EXE + RA (barre grigio scuro) rispetto alle cellule non trattate (NT, barre bianche) valutate in momenti diversi (24, 48 e 72 h). In ordinata la percentuale di cellule recanti neuriti. * $p < 0.05$ vs NT.

I cambiamenti morfologici mediati da EXE ed RA presentano caratteristiche diverse, come indicato dal fatto che il numero di neuriti/cellula era significativamente maggiore solo dopo il trattamento con EXE, mostrato nella figura 4.

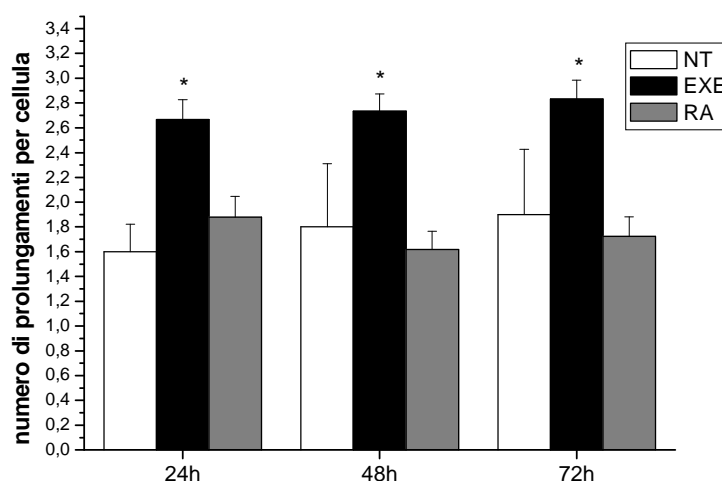


Fig 4: Analisi delle variazioni morfologiche indotte da EXE (barre nere) o RA (barre grigie) rispetto alle cellule non trattate (NT, barre bianche) valutate in momenti diversi (24, 48 e 72 h). In ordinata il numero di prolungamenti per cellula. * $p < 0.05$ vs NT.

Inoltre, la lunghezza dei neuriti indotti dall'esposizione ad EXE è nettamente inferiore a quella dei neuriti indotti da RA, come riportato in figura 5. Nel complesso, questi dati suggeriscono che EXE può indurre la differenziazione di cellule SH-SY5Y influenzando il numero dei neuriti, piuttosto che la loro lunghezza.

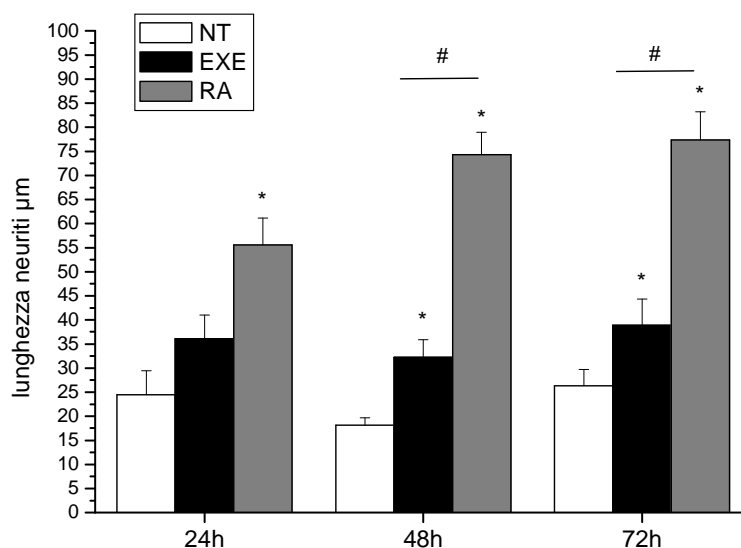


Fig 5: Analisi delle variazioni morfologiche indotte da EXE (barre nere) o RA (barre grigie) rispetto alle cellule non trattate (NT, barre bianche) valutate in momenti diversi (24, 48 e 72 h). In ordinata la lunghezza dei prolungamenti cellulari. * $p < 0.05$ vs NT.

Analisi del citoscheletro di actina e tubulina

La differenziazione neuronale è accompagnata da profonde alterazioni morfologiche che prevedono lo sviluppo di neuriti dendritici ed assoni. Il primo evento morfogenetico nella fuoriuscita del neurite prevede la riorganizzazione generale del citoscheletro che coinvolge sia i microtubuli che l'actina filamentosa. Pertanto, al fine di verificare l'effetto di EXE sulla differenziazione neuronale abbiamo analizzato mediante microscopia ad immunofluorescenza l'espressione delle proteine del citoscheletro tubulina e actina, che formano rispettivamente microtubuli e microfilamenti (Fig. 6). In A e D è mostrata la distribuzione di actina e tubulina, rispettivamente, nelle cellule non trattate. Il trattamento con EXE aumentava significativamente l'accumulo di actina filamentosa (F) e la

formazione di strutture simil-cono (Fig. 6B), mentre RA induceva modifiche più deboli nella polimerizzazione dell'actina (Fig. 6C). Nelle cellule trattate con EXE venivano fortemente aumentate le fibre di stress nel citoplasma sotto forma di filamenti lunghi e paralleli che attraversano la cellula da un'estremità all'altra. L'analisi della tubulina misurata mediante valutazione semi-quantitativa della sua distribuzione e intensità ha rivelato l'accumulo dei microtubuli nei neuriti sia dopo trattamento con EXE che con RA (Fig. 6E-F), ma l'effetto è più evidente in cellule trattate con EXE (Tabella I). Queste osservazioni suggeriscono una polimerizzazione coordinata di actina e tubulina indotta da EXE nelle cellule SH-SY5Y, e mirante a favorire la formazione di neuriti.

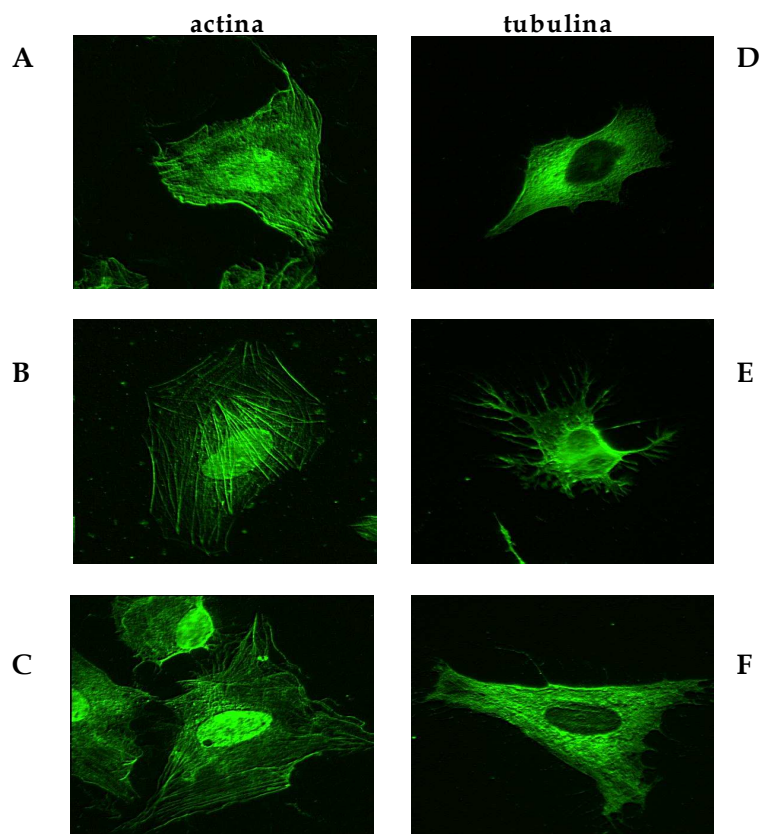


Fig 6: Immagini rappresentative al microscopio ad epifluorescenza (100X di ingrandimento), della distribuzione di actina (pannelli a sinistra) e tubulina (pannelli a destra) in cellule SH-SY5Y non trattate (A e D) dopo il trattamento con EXE (B ed E) o con RA (C e F).

| | Corpo cellulare | Neuriti |
|------------|------------------------|----------------|
| NT | +++ | + |
| EXE | +++ | +++ |
| RA | +++++ | ++ |

Tabella I: Valutazione Semi-quantitativa dell'intensità e della distribuzione della tubulina, effettuata da 3 diversi operatori in almeno 10 campi.

Western Blot per cofilina

La cofilina è un membro della famiglia dei fattori depolimerizzanti l'actina, che regolano il turnover dei filamenti di actina e la cui attivazione è modulata dallo stato di fosforilazione. Abbiamo effettuato un'analisi western blot per le forme totale e fosforilata di cofilina e abbiamo trovato che la forma fosforilata, cioè inattiva, della proteina risultava significativamente aumentata dopo 24 h di trattamento con EXE, indicando che la polimerizzazione dell'actina avviene parallelamente all'inibizione dell'attività della cofilina (Fig. 7A-B).

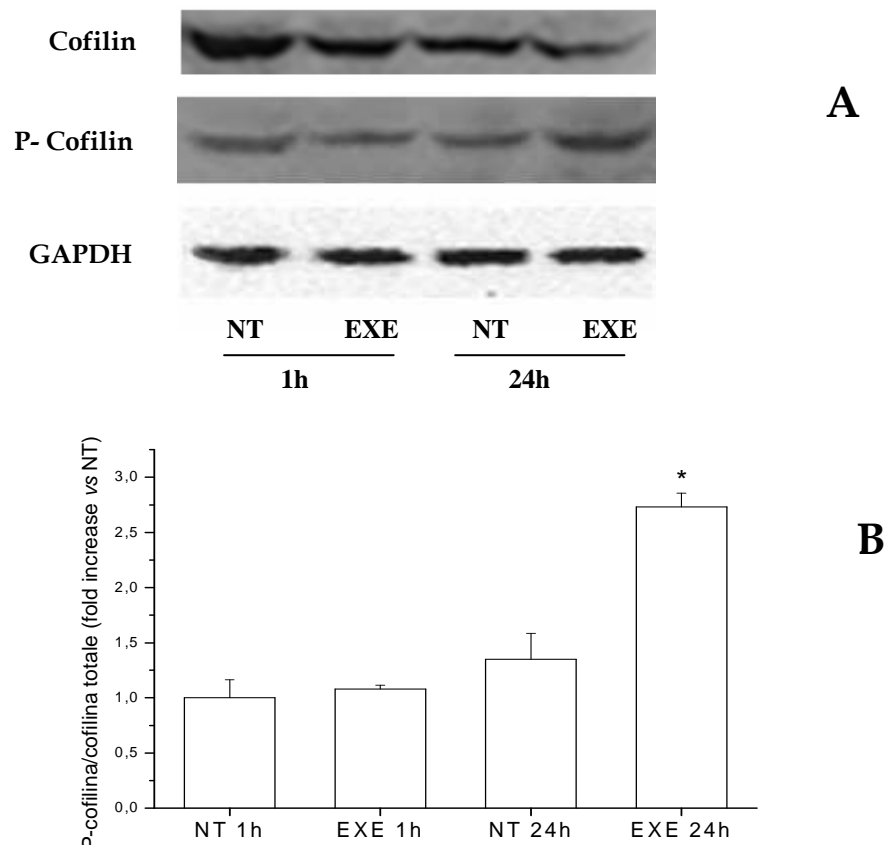


Fig 7:

Esperimento rappresentativo di un western blot per l'espressione delle proteine Cofilina, Cofilina fosforilata (P-Cofilina) e GAPDH (A) rilevata in cellule SH-SY5Y dopo 1 h e 24 h di trattamento con EXE. Analisi densitometrica del rapporto P-cofilin/cofilin (B) *= $p < 0,05$ vs NT, one-way ANOVA test.

Effetti di EXE ed RA sulle proprietà passive di membrana delle cellule SH-SY5Y

Il potenziale di membrana a riposo (RMP), valutato in modalità current-clamp in un bagnetto contenente soluzione fisiologica, è risultato più depolarizzato in cellule trattate con RA (Fig. 8A). La capacità di membrana (C_m), una stima della superficie cellulare, quantificata in modalità voltage-clamp, ha mostrato un aumento significativo sia nelle cellule trattate con EXE che con RA (Fig. 8B). La conduttanza specifica della membrana a riposo (G_m / C_m), era ridotta in cellule trattate con EXE, mentre in cellule trattate con RA l'aumento osservato non era significativo (Fig. 8C). In conclusione, sia EXE che RA inducevano l'estensione delle cellule SH-SY5Y, ma con azioni diverse, dal momento che EXE riduceva G_m / C_m e manteneva la RMP mentre nelle cellule trattate con RA avveniva il contrario.

Effetti di EXE e RA sulla densità di Stretch-activated channels, I_{SAC} / C_m in cellule SH-SY5Y

Come illustrato in precedenza, abbiamo osservato che il trattamento con EXE aumenta notevolmente l'accumulo di F-actina (Fig. 6B), mentre l'RA induce una modifica più debole nella polimerizzazione di actina (Fig. 6C). Considerando che è stato riportato in letteratura che la polimerizzazione dell'actina e la sua capacità di contrazione aumentano la rigidità della membrana plasmatica (Sbrana 2008) che, a sua volta, aumenta la I_{SAC} / C_m (Formigli 2009) abbiamo misurato quest'ultimo parametro per valutare il suo rapporto con la diversa formazione di F-actina nelle cellule trattate con EXE o RA. I risultati indicano chiaramente che EXE aumentava significativamente I_{SAC} / C_m , mentre l'aumento indotto da RA era significativamente inferiore rispetto a quello ottenuto con EXE (controllo 2.1 ± 0.25 , EXE 12.2 ± 2.5 , RA 2.8 ± 0.75 , $p < 0.005$ e $P < 0.05$, rispettivamente,

confrontati con il controllo). Gli esperimenti effettuati con GdCl_3 , un noto bloccante dei SAC, hanno confermato che le correnti registrate passavano essenzialmente attraverso i SAC (Fig. 8G). In conclusione, il notevole aumento dell'accumulo di F-actina in cellule trattate con EXE era accompagnato da un forte aumento dell' I_{SAC}/C_m , mentre RA presentava un'azione più debole sull'accumulo di F-actina e sulla I_{SAC}/C_m .

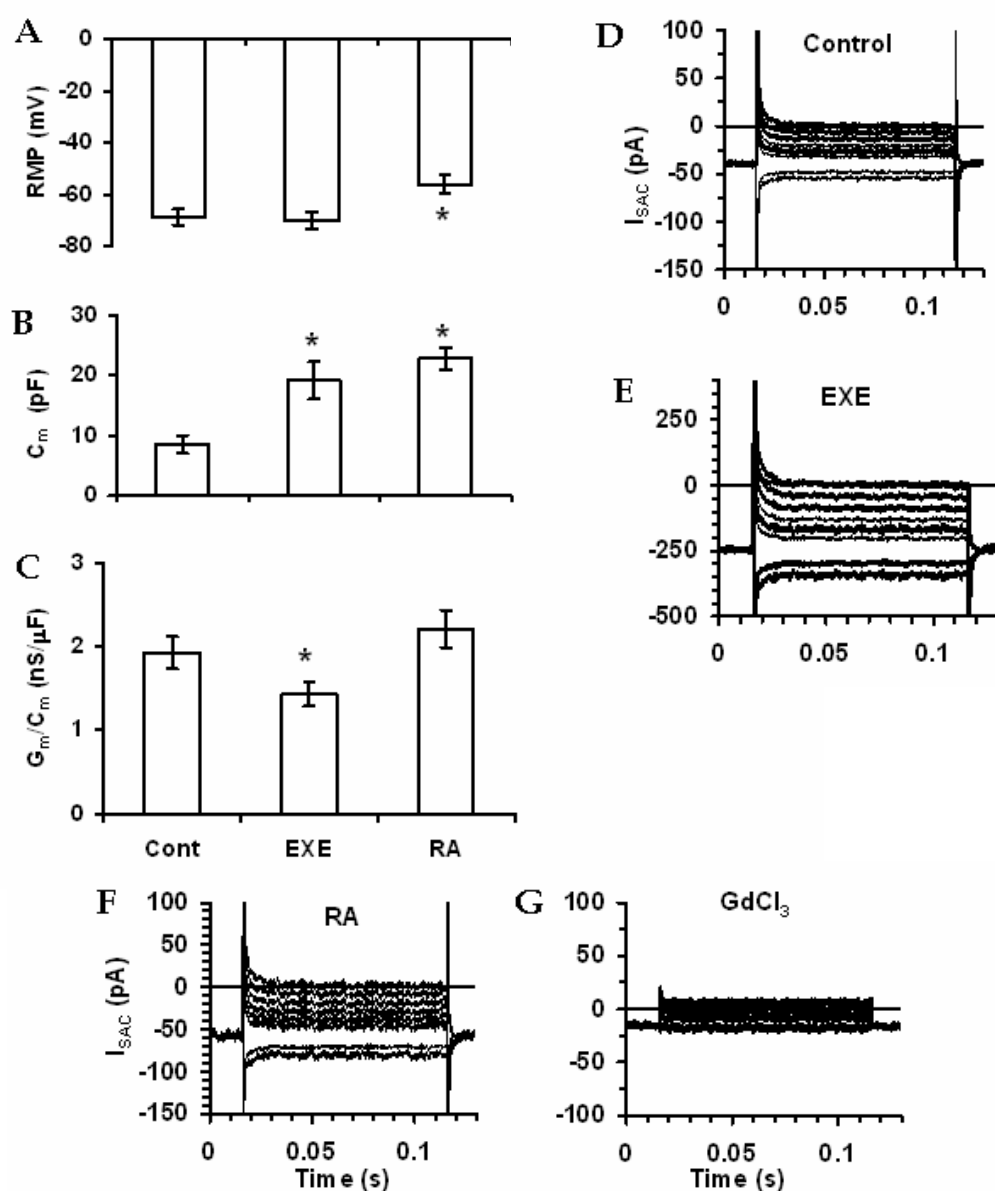


Fig 8: Effetti di EXE e RA sul potenziale di riposo di membrana e sulle proprietà passive di membrana delle cellule SH-SY5Y (AC). I dati sono stati registrati in soluzione fisiologica in condizione di controllo (Cont) e su cellule trattate con EXE o RA. A: potenziale di riposo di membrana, RMP; B: capacità di membrana, C_m ; e C: conduttanza normalizzata di membrana, G_m/C_m . * $p < 0.05$ versus valori di controllo. In ogni condizione sperimentale sono state presi i valori medi \pm ESM di 25-29 cellule. Effetti di EXE e RA su I_{SAC} in cellule SH-SY5Y (D-G). Analisi rappresentativa del decorso

temporale della I_{SAC} evocata da un protocollo di impulsi lunghi 100 ms, applicato a partire da -60 mV che passa da -80 a 0 mV con incrementi di 10 mV. D: cellule di controllo; E: EXE aumentava significativamente I_{SAC}/C_m , mentre l'effetto di potenziamento dell' RA era significativamente inferiore (F) rispetto all'EXE. G: L'aggiunta del $GdCl_3$ bloccante dei SAC, riduceva al minimo le correnti ioniche, dato che conferma la loro origine dai SAC.

Effetti di EXE ed RA sulle proprietà elettrofisiologiche dei canali ionici voltaggio-dipendenti in cellule SH-SY5Y

Sulla base di studi precedenti che indicano un'azione positiva di RA sulla differenziazione dei neuroni (Abemayor 1989, Anghileri 2008, Erceg 2008, Martinez-Monedero 2008), sono stati valutati gli effetti di EXE sulle proprietà elettrofisiologiche delle cellule SH-SY5Y e confrontati con quelli di RA. Nella soluzione di TEA 20 mM le cellule non trattate esibivano una corrente di sodio I_{Na} , come mostrato in un tipico esperimento visualizzato in fig. 9A. La soglia di voltaggio di I_{Na} era di circa -60 mV. Il trattamento con EXE incrementava decisamente l'ampiezza di I_{Na} e questo si verificava in modo più evidente nelle cellule trattate con RA (Fig. 9B-C). Il plot normalizzato di V/I determinato al picco di corrente e relativo a tutte le cellule analizzate è mostrato in fig. 9D. L'ampiezza massima di corrente è stata registrata a -15 ± 5 mV nelle cellule di controllo, mentre era a -20 ± 5 mV in cellule trattate con EXE o RA (Fig. 9D). I parametri di Boltzmann delle curve di attivazione e inattivazione presentavano dei cambiamenti a seguito dei trattamenti con EXE ed RA (Fig. 9E). La massima corrente di picco e la G_{Na} erano aumentate in modo simile rispetto al controllo indicando che l'aumento della densità di corrente era dovuto prevalentemente all'aumentata conduttanza del canale. Il voltaggio semimassimale di attivazione e inattivazione, V_a e V_i , sono stati spostati verso valori negativi, rispettivamente, di circa 5 e 3 mV (EXE) e di 7 e 4 mV (RA) rispetto al controllo. Inoltre, i trattamenti non hanno influenzato k_a mentre k_i era ridotta (Fig. 9E; dati della Tabella II). In conclusione, EXE e RA aumentano la disponibilità di I_{Na}

inducendo uno shift lieve ma significativo dei voltaggi semimassimali V_a e V_i e aumentando l'espressione e/o la conduttanza dei canali Na^+ .

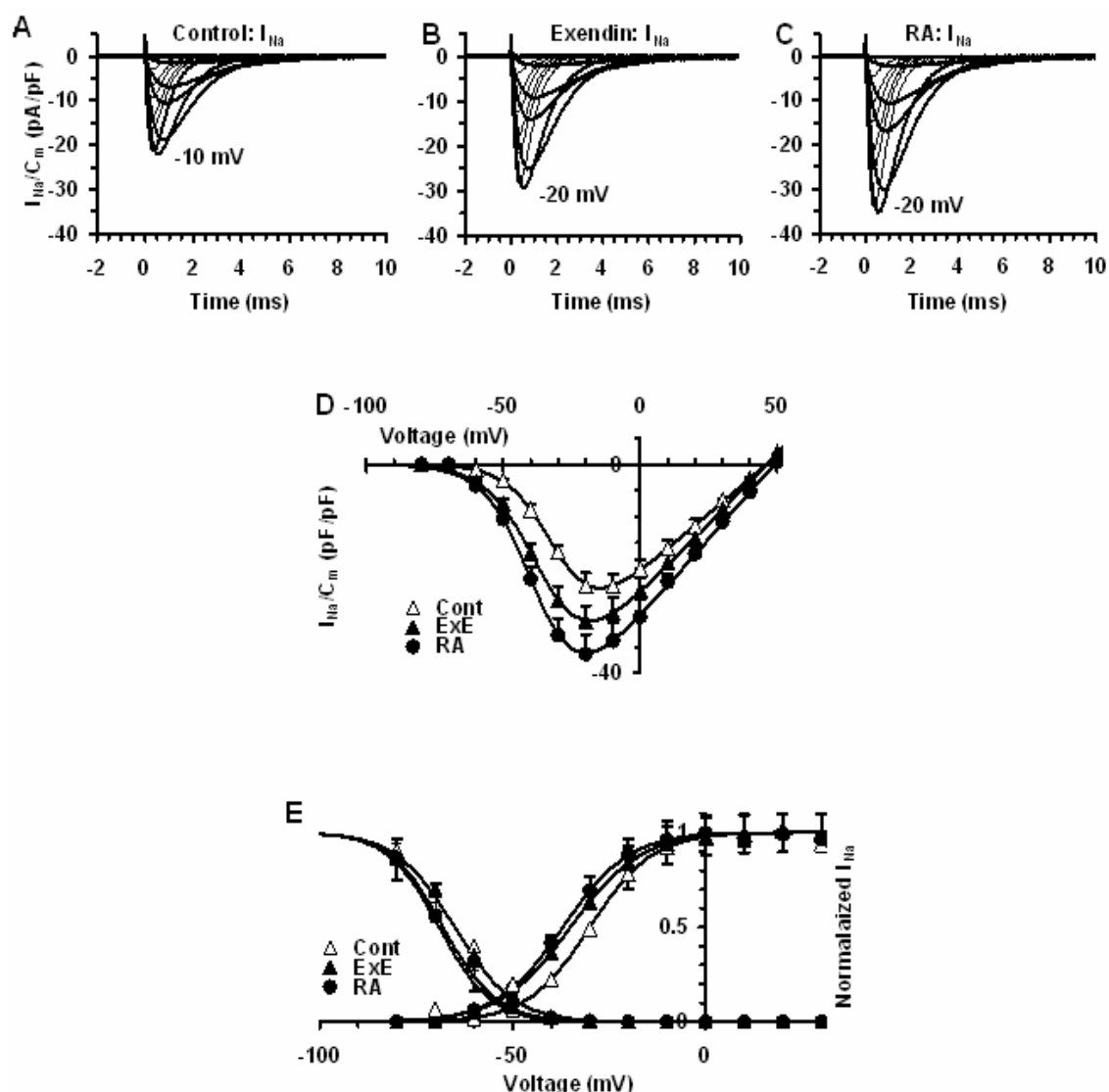


Fig 9: Effetti di EXE ed RA sui canali Na^+ voltaggio-dipendenti in cellule SH-SY5Y. A: tipiche tracce I_{Na} registrate in soluzione di TEA 20mM in presenza di nifedipina (10 μM), evocata da un protocollo di impulsi applicati da un HP di -80 mV con impulsi a step di 1-s che vanno da -70 a 50 mV a steps di 10 mV. La soglia di tensione di I_{Na} era a -50 mV. B: Il trattamento con EXE aumentava l'ampiezza di I_{Na} in modo più evidente nelle cellule trattate con RA (C). In A-C sono indicati i voltaggi che suscitavano la massima I_{Na} . D: grafico I-V normalizzato riguardante il picco di corrente relativo a tutte le cellule esaminate. Sovrapposte ai dati le curve Boltzmann. E: dati normalizzati di attivazione e inattivazione di I_{Na} nel controllo SH-SY5Y e dopo trattamento con EXE o RA con le relative curve Boltzmann sovrapposte; le curve di Boltzmann per l'attivazione sono ottenute dai fitting in C. I parametri relativi alle curve Boltzmann sono riportati nella tabella II. In ogni condizione sperimentale i dati sono stati ottenuti da 26-43 cellule.

Per valutare la presenza di canali Ca^{2+} funzionali, abbiamo utilizzato un bagno di soluzione TEA- Ca^{2+} (Fig. 10). Nelle cellule SH-SY5Y le correnti dei canali Ca^{2+}

consistevano di due componenti principali: i) una corrente verso l'interno transitoria e attivata da basso voltaggio (corrente Ca^{2+} di tipo T-, $I_{\text{Ca, T}}$) che si registrava da -50 mV, e ii) una corrente attivata da alto voltaggio ed a lenta inattivazione (IHVA). Quest'ultima è stata identificata a partire da -40 mV come una corrente a lento decadimento sovrapposta alla transiente $I_{\text{Ca, T}}$. L'attivazione e l'inattivazione delle curve di Boltzmann di queste due correnti concorda con la presenza di canali Ca^{2+} di tipo T e HVA (Fig. 10H, I). Questo dato è stato confermato utilizzando Cd^{2+} e nifedipina, dal momento che nessuno dei due influiva sulla corrente di tipo T (Fig. 10D). Invece, il tipo HVA è stato bloccato dal Cd^{2+} , ma non completamente da nifedipina, dal momento che una corrente di modesta entità (circa il 10% rispetto al controllo) e lento decadimento era ancora osservabile nelle cellule trattate con nifedipina. Di conseguenza, le correnti HVA sono costituite prevalentemente da correnti nifedipina-sensibili di tipo L e una piccola frazione di altre correnti Ca^{2+} , come i tipi N, P, Q ed R (Fig. 10D). Il trattamento con EXE e RA aumentava decisamente l'ampiezza di $I_{\text{Ca, T}}$ ed $I_{\text{Ca, L}}$ (Fig. 10A, B, C) fatto osservato in tutti gli esperimenti. I plot I-V normalizzati e le relative curve di Boltzmann normalizzate riferite alle correnti di tipo T ed L sono mostrati in fig. 10H e 10I. Ancora una volta, EXE e RA inducevano cambiamenti sulle correnti Ca^{2+} simili a quelli osservati per I_{Na} , come l'aumento della $G_{\text{Ca, T}}$ e $G_{\text{Ca, L}}$, uno spostamento verso un potenziale più negativo dei potenziali semimassimali di attivazione e inattivazione V_a e V_i e una diminuzione di k_a e k_i . In particolare, sia l'incremento dell'ampiezza massima di corrente che della conduttanza di correnti Ca^{2+} di tipo T ed L erano superiori a quelli di I_{Na} , e gli aumenti più elevati erano quelli relativi alla corrente Ca^{2+} di tipo L. Infine, alcuni parametri di Boltzmann venivano alterati più da RA che da EXE (tabella II).

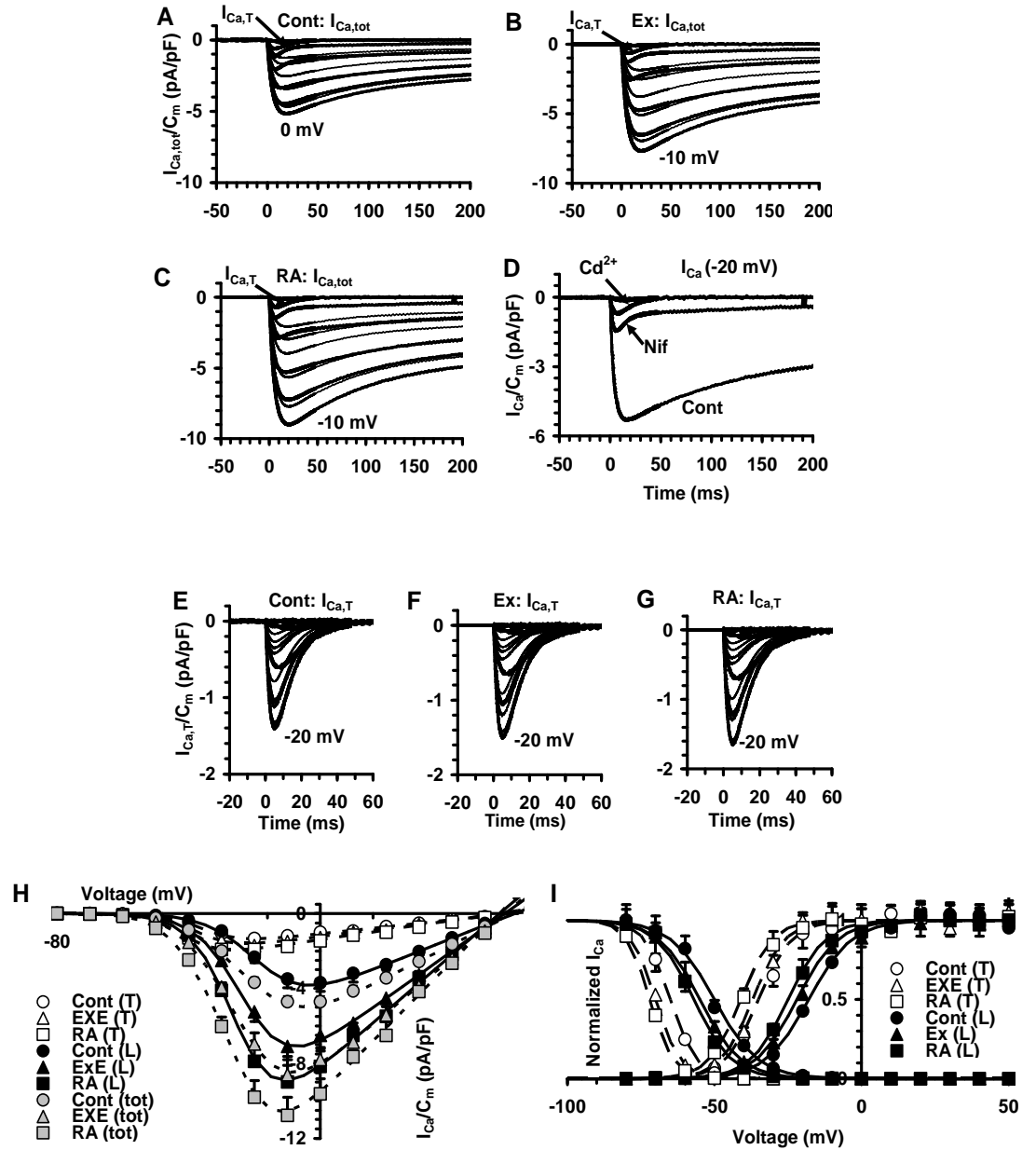


Fig 10: Effetti di EXE e RA sui canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti nelle cellule SH-SY5Y. Correnti Ca^{2+} inward in SH-SY5Y. Tracce rappresentative I_{Ca} registrate in soluzione TEA- Ca^{2+} con TTX (1 μM) aggiunti ottenute da una cellula SH-SY5Y di controllo (A) e in cellule trattate con EXE (B) o RA (C). Qui sono mostrate tracce di correnti evocate da un HP di -80 mV da steps depolarizzanti da -70 a 50 mV mediante incrementi di 10 mV. L' $I_{\text{Ca,tot}}$ era costituita da due componenti principali. Le tracce a -50 mV mostrano chiaramente la presenza di una corrente transiente di tipo T- Ca^{2+} a rapida attivazione ed inattivazione $I_{\text{Ca,T}}$ (indicata da una freccia nella traccia a -50 mV) da -40 mV una corrente attivata da alto voltaggio ed a lenta inattivazione ($I_{\text{Ca,HVA}}$), è stata identificata come una corrente a decadimento più lento sovrapposta al transiente $I_{\text{Ca,T}}$ D). Correnti Ca^{2+} indotte da uno step di voltaggio a -20 mV senza (Cont) e in presenza di nifedipina (10 μM). EG) $I_{\text{Ca,T}}$ registrate ad un potenziale mantenuto a -50 mV che inattiva la maggior parte delle $I_{\text{Ca,HVA}}$. H) Plot normalizzato I-V calcolato al picco di corrente nel controllo e nel trattamento con EXE o RA. Dati delle correnti totali (tot) Ca^{2+} con le curve sovrapposti che costituiscono il miglior fitting come somma di due funzioni di Boltzmann; i simboli aperti rappresentano i dati di $I_{\text{Ca,T}}$ ottenuti in presenza di nifedipina con curve sovrapposte che sono il fitting migliore di una funzione di Boltzmann. (I) Dati normalizzati di attivazione e inattivazione dei per le correnti Ca^{2+} di tipo T ed L nel

controllo e con trattamento con EXE o RA, con sovrapposto il relativo fitting di Boltzmann; i dati e le curve di Boltzmann per l'attivazione sono ottenuti dai fitting in H. I parametri relativi di Boltzmann sono riportati nella tabella II. In ogni condizione sperimentale i dati sono stati ottenuti da 22-27 cellule.

| Currents | I _{Na} | I _{Na} | I _{Na} | I _{Ca,T} | I _{Ca,T} | I _{Ca,T} | I _{Ca,L} | I _{Ca,L} | I _{Ca,L} |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Param | Cont | EXE | RA | Cont | EXE | RA | Cont | EXE | RA |
| I _p /I _{p,cont} | 1±0.1 | 1.3±0.2 * | 1.7±0.2 ** | 1±0.1 | 1.2±0.1 * | 1.2±0.1 * | 1 | 1.7±0.2 **, # | 1.9±0.2 **, # |
| G/G _{cont} | 1±0.1 | 1.2±0.1 * | 1.3±0.1 * | 1±0.1 | 1.3±0.1 * | 1.4±0.1 **, § | 1±0.1 | 1.8±0.2 **, # | 2.2±0.2 **, §, # |
| V _a (mV) | -30±2 | -35±2 * | -37±2 *, § | -35±2 | -37±2 | -41±3 *, § | -18±1 | -22±1 * | -25±2 *, § |
| k _a (mV) | 8±0.3 | 9±0.5 | 8±1 | 5.7±0.6 | 5.5±0.4 | 5.4±0.5 | 7.4±0.3 | 7±0.4 | 6.4±0.5 *, § |
| V _i (mV) | -65±2 | -68±2 * | -69±3 * | -65±2 | -70±2 * | -72±2 ** | -50±2 | -55±2 * | -57±2 **, § |
| k _i (mV) | 7.5±0.3 | 6.5±0.3 * | 6.6±0.4 * | 4.5±0.2 | 4.2±0.3 | 4±0.2 * | 7.5±0.4 | 6.5±0.4 * | 6.6±0.4 * |

Tabella II Effetto del trattamento con RA ed EXE sui parametri di Boltzmann delle curve di attivazione e inattivazione per l'I_{Na} e le correnti Ca²⁺ di tipo T ed L in cellule SH-SY5Y * e **p<0.05 e <0.01 versus il corrispondente controllo. § P<0.05 RA versus EXE. # P<0.05 I_{Ca,L} versus I_{Ca,T} ed I_{Na}. I_p/I_{p,cont} e G/G_{cont} sono, rispettivamente, il tasso di correnti di picco e conduttanza in cellule trattate rispetto a quelle di controllo. Per ogni tipo di corrente, I_p/I_{p,cont} sono tassi relativi ai rispettivi controlli.

EXE impedisce l'apoptosi cellulare indotta da H₂O₂

Al fine di verificare se EXE esercitasse un effetto protettivo contro la morte cellulare mediata da stress ossidativo abbiamo effettuato dei saggi di vitalità. Il trattamento con H₂O₂ 20 e 50 µM riduceva significativamente la vitalità cellulare. In seguito alla pre-incubazione overnight EXE proteggeva le cellule SH-SY5Y dal danno ossidativo, come dimostrato sia dal saggio MTS (Fig. 11A) che dal Trypan test (fig. 11B). Inoltre, la valutazione dell'apoptosi è stata effettuata mediante saggio TUNEL. Come mostrato nella figura. 11C, la percentuale di cellule apoptotiche era significativamente maggiore nel gruppo trattato con H₂O₂ rispetto al gruppo di controllo. Tuttavia, il pre-trattamento con EXE contrastava efficacemente l'apoptosi indotta da H₂O₂. Questi risultati confermano l'azione neuroprotettiva di EXE anche in un modello di cellule neuronali umane.

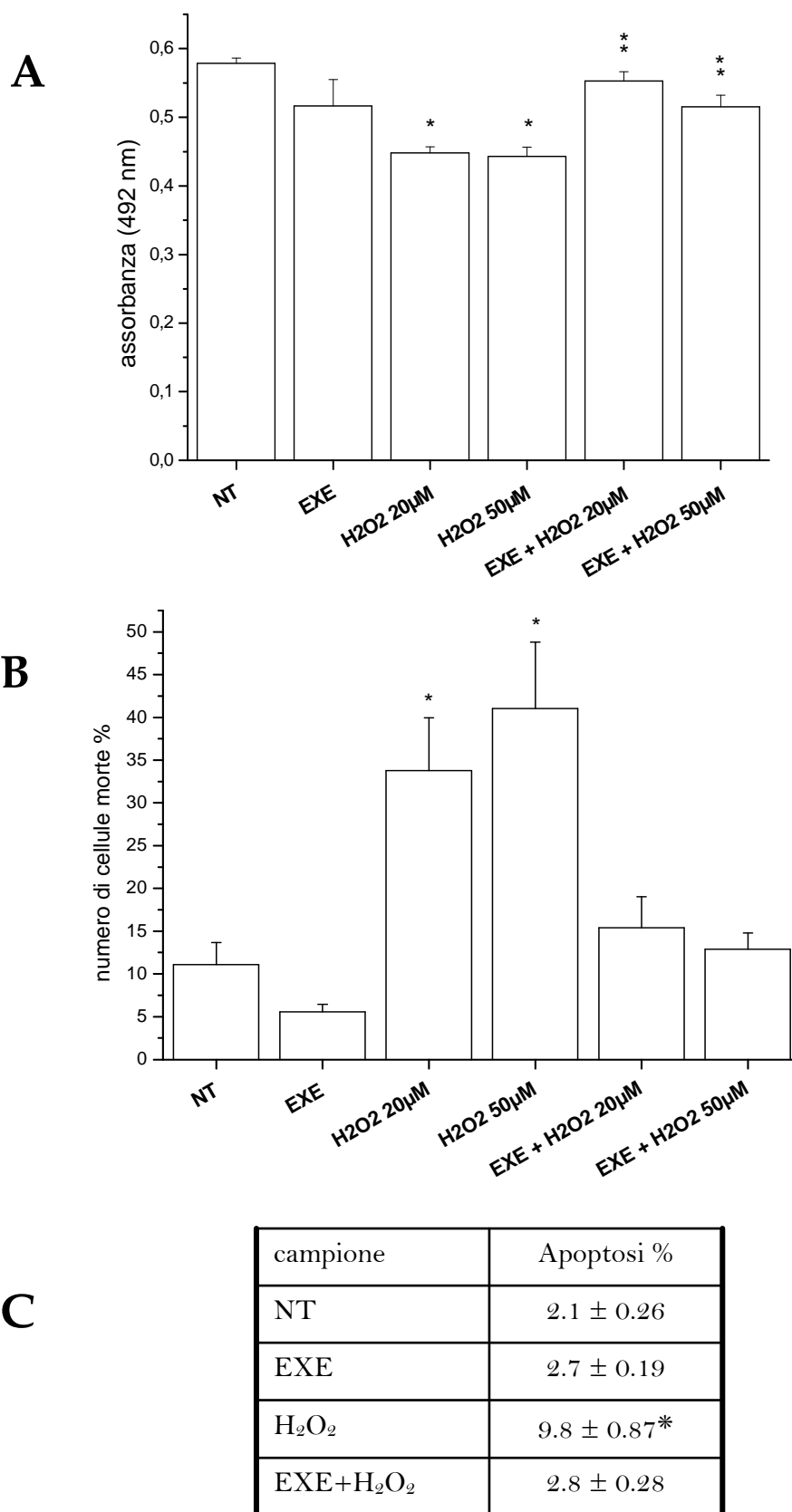
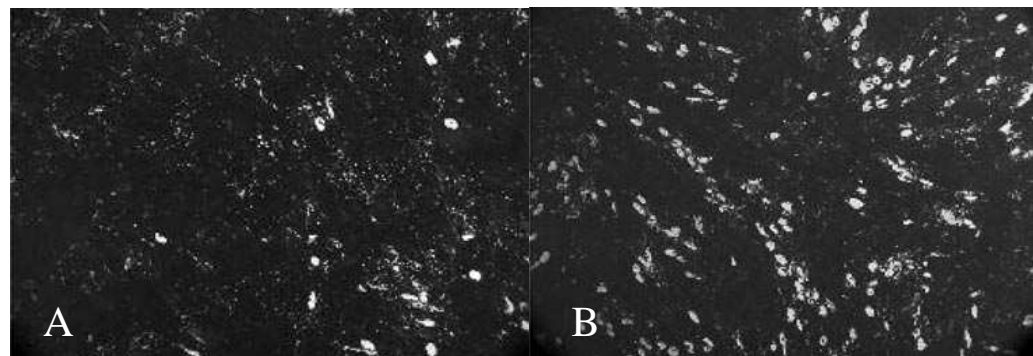


Fig 11: Effetto della pre-incubazione con EXE sulla vitalità delle cellule SH-SY5Y trattate con H₂O₂ (20 e 50 µM) come valutato dai saggi MTS (A) e Trypan blue (B). I dati sono riportati come media ± SE *= p <0,05 vs NT. C: Numero di cellule positive all'analisi TUNEL/100 cellule (media ± SE di almeno 10 campi) rilevate in cellule SH-SY5Y dopo la somministrazione di H₂O₂ con o senza pre-trattamento con EXE. *= p <0,05 vs NT, one-way ANOVA test.

2- EFFETTI DEL RGZ SULL'OSTEOBLASTOGENESI

Effetto del RGZ sul differenziamento in senso adipocitario ed osteoblastico delle cellule hMSC

Sia la valutazione morfologica che l'immunofenotipo confermano le caratteristiche delle cellule hMSC a partire dal primo passaggio in cultura, secondo gli standard della Società Internazionale per la Terapia cellulare (Dominaci 2006). La differenziazione delle cellule hMSC in senso osteogenico e adipogenico risultava facilmente inducibile, indicando che queste cellule sono di derivazione mesenchimale. Tra i geni di tipica espressione mesenchimale, le cellule hMSC risultano positive per l'espressione di sialoproteina ossea, osteocalcina, PPAR γ , collagene tipo I e fosfatasi alcalina, come dimostrato in un nostro precedente lavoro (Benvenuti 2006). L'aggiunta di RGZ 1 μ M al cocktail adipogenico normalmente utilizzato induceva un notevole aumento in gocce lipidiche (Figura 12A-B).



| C | Cells | FABP4 mRNA |
|---|--------------|------------------------------|
| | hMSC | 1 \pm 0.1 |
| | hMSC-A | 1458.2 \pm 72 (f. incr.) |
| | hMSC-a + RGZ | 11910.9 \pm 570 (f. incr.) |

Fig 12: Immagini al microscopio ottico in campo scuro delle cellule hMSC indotte verso il fenotipo adipocitario in assenza (A) e in presenza (B) di RGZ. C) Effetto del RGZ sull'espressione di FABP4 nelle cellule di controllo (hMSC), hMSC coltivate in presenza di cocktail di induzione adipocitaria (hMSC-a), e in presenza di cocktail di induzione adipocitaria + RGZ (hMSC-a + RGZ) mediante RT-PCR in real time. I numeri (media \pm SE) indicano il fold-increase rispetto all'espressione basale delle hMSC, considerata 1.

Al contrario, quando le hMSC venivano indotte a differenziare verso osteoblasti, il RGZ inibiva fortemente l'osteoblastogenesi e promuoveva l' adipogenesi, come si osservava dalla comparsa di gocce lipidiche all'interno delle cellule, che erano visibili al microscopio in campo chiaro e scuro (Figura 13 A-D).

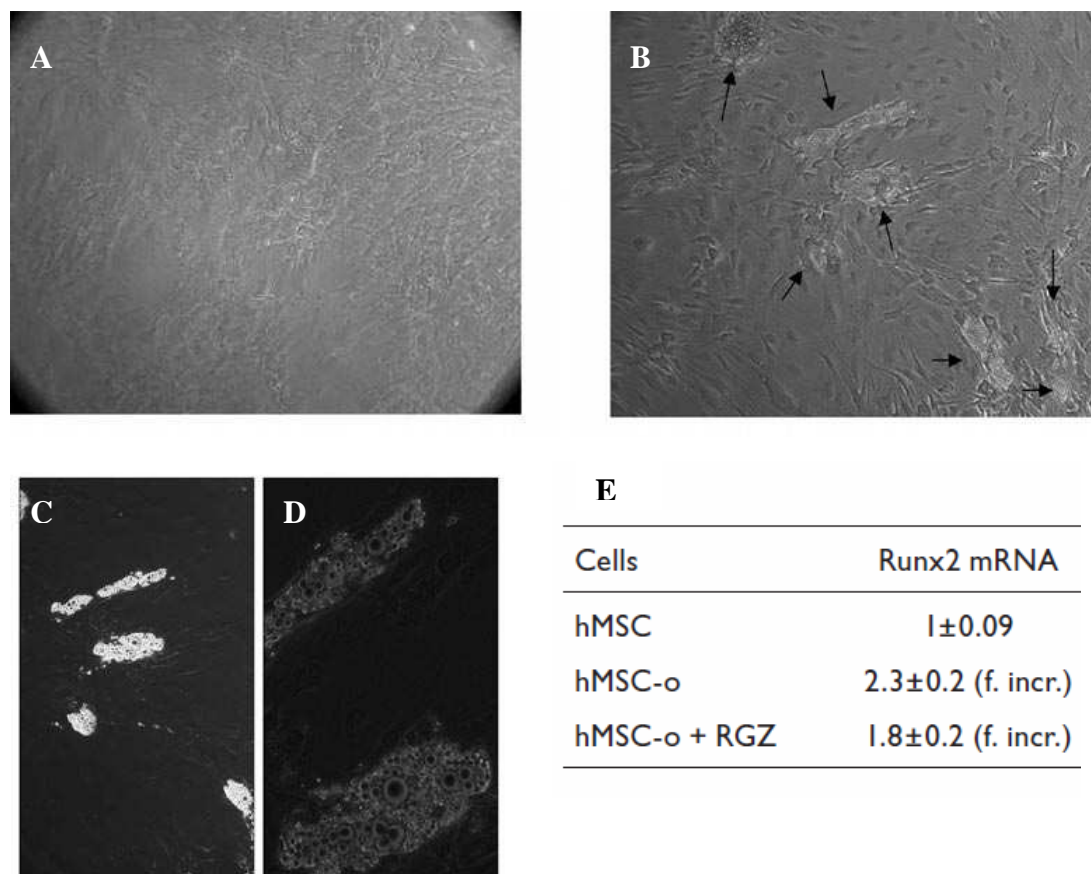


Fig. 13 Immagini al microscopio invertito a contrasto di fase delle hMSC indotte verso il fenotipo osteoblastico (A). B) Effetto del RGZ 1 μ M su hMSC indotte a differenziare ad osteoblasti (le frecce nere indicano le cellule che mostrano gocce lipidiche). C) Gocce lipidiche all'interno delle hMSC trattate con RGZ osservate mediante microscopia in campo scuro. D) Immagini in microscopia ottica di hMSC marcate con Oil Red O. E) Effetto del RGZ sull'espressione Runx2 in hMSC, in hMSC indotte verso il fenotipo osteoblastico (hMSC-o), e in hMSC indotte verso il fenotipo osteoblastico + RGZ (hMSC-o + RGZ) mediante real-time RT-PCR. I numeri (media \pm SE) indicano il fold-increase vs l'espressione basale delle hMSC, considerata 1.

Effetto del RGZ sull'espressione di geni tipici del differenziamento adipocitario ed osteoblastico

L'effetto del RGZ sull'espressione dei geni associati all'induzione del fenotipo osteoblastico o adipocitario è stato analizzato mediante real-time RT-PCR. Il cocktail di differenziamento adipogenico induceva un marcato aumento

dell'mRNA di FABP4 (1458 volte) in nelle hMSC; quando le cellule venivano stimulate a differenziare in presenza di RGZ 1 μ M, la quantità di mRNA veniva ulteriormente aumentata (11911 volte rispetto alle hMSC di controllo) (Fig. 12 C). Il cocktail di differenziamento osteogenico aumentava l'espressione di Runx2, uno dei fattori di trascrizione più importanti nel processo di differenziazione osteogenica (2,3 volte hMSC vs controllo), mentre il RGZ riduceva l'effetto del cocktail osteogenico sull'espressione di Runx2 (Fig. 13 E).

Livello basale dell'espressione di AR ed ER nelle hMSC

Per poter procedere con i trattamenti delle hMSC con i vari ormoni abbiamo verificato la presenza dei rispettivi recettori in real-time RT PCR. Le cellule hMSC esprimono l'mRNA di AR ed ER (di tipo α e β) in condizioni sperimentali basali, valutato mediante real-time RT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t} * 10^5$: ER α 28.7; ER β 1.16; AR 3.79).

Effetto di estrogeni, androgeni e fitoestrogeni sull'adipogenesi

Come già evidenziato in precedenza, la differenziazione adipogenica delle hMSC era facilmente inducibile, a supporto del fatto che le cellule fossero di derivazione mesenchimale. Il cocktail adipogenico aumentava notevolmente il numero di adipociti differenziati, come valutato in microscopia ottica ($26,8\% \pm 7$, Fig. 14A). Parallelamente veniva incrementata l'espressione di PPAR γ (Fig. 14F); quando le hMSC venivano indotte a differenziare in presenza di RGZ 1 μ M, il numero delle cellule adipose ($49,8\% \pm 9$) e la quantità di mRNA venivano ulteriormente incrementati (Fig.14B, F). Nè il trattamento con genisteina (G) 10 nM nè con quercetina (Q) 5 μ M influenzavano la presenza di lipidi nelle cellule o l'espressione di PPAR γ , mentre il $17\beta E_2$ (E) 10 nM inibivano in modo significativo questi parametri (Fig.14 C-F).

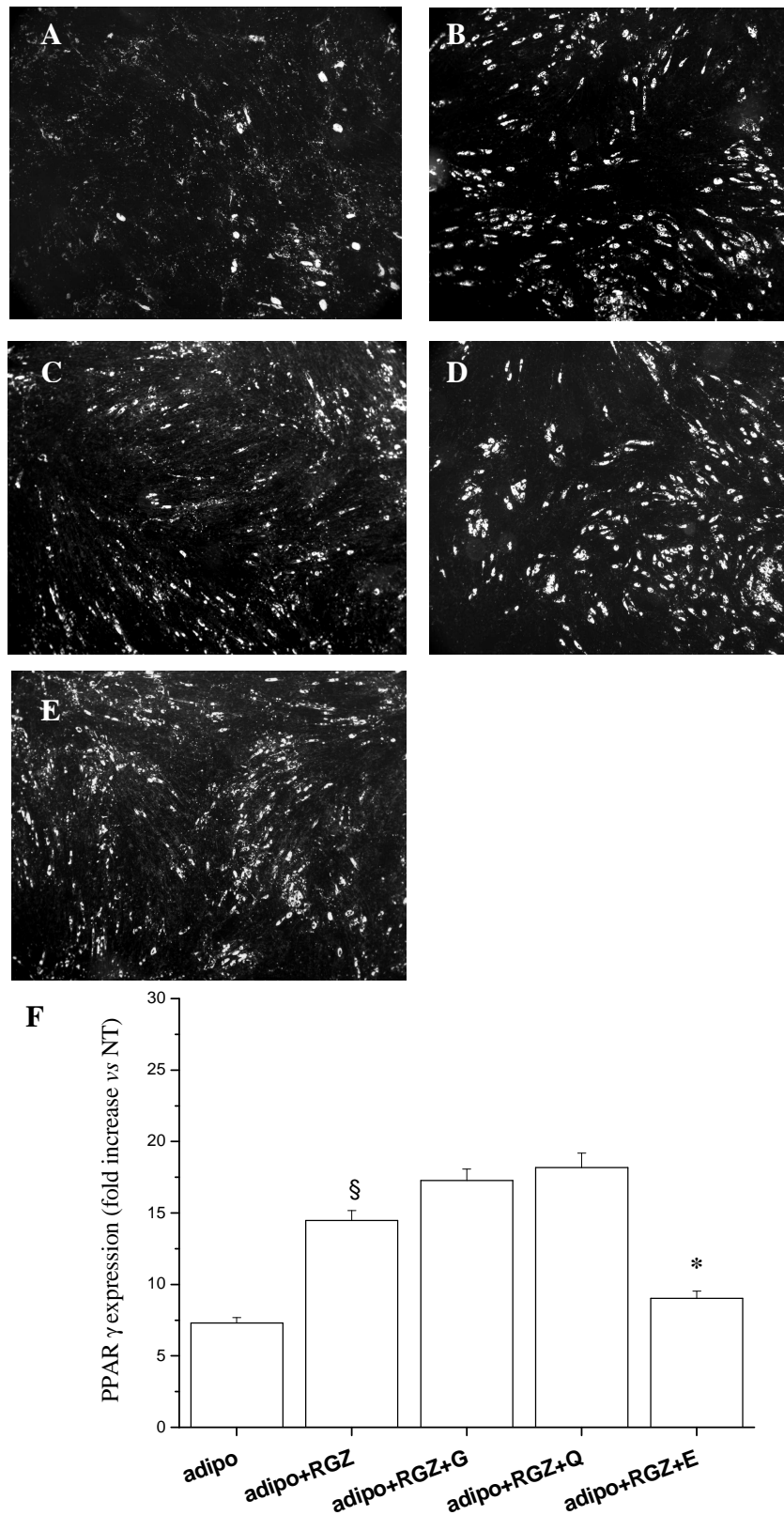


Fig 14: Gocce lipidiche osservabili mediante microscopia in campo scuro all'interno delle hMSC trattate con il solo cocktail adipogenico (A); con aggiunta di RGZ 1 μ M (B); con aggiunta di RGZ+17 β -E₂ 10 nM (C); con aggiunta di RGZ+G 10 nM (D); con aggiunta di RGZ+Q 5 μ M (E). F: Incremento dell'espressione di PPAR γ rispetto all'espressione basale delle hMSC, considerata 1 * = $p < 0.05$ vs adipo+RGZ § = $p < 0.05$ vs adipo.

Tutti gli androgeni, T, DHT e R1881 risultavano in grado di inibire drasticamente il numero di adipociti differenziati ($11.2\% \pm 8\%$, $19.5\% \pm 6.1\%$, $15.7\% \pm 5.2\%$, rispettivamente; Fig. 15 A-D). L'agonista sintetico non aromatizzabile dell' AR metiltrienolone R1881 (10 nM) ed in modo più evidente il testosterone (T) 10 nM, diminuivano marcatamente l'espressione di PPAR γ ; l'androgeno naturale non aromatizzabile diidrotestosterone DHT (10 nM) presentava anch'esso un effetto inibitorio significativo, anche se meno evidente.

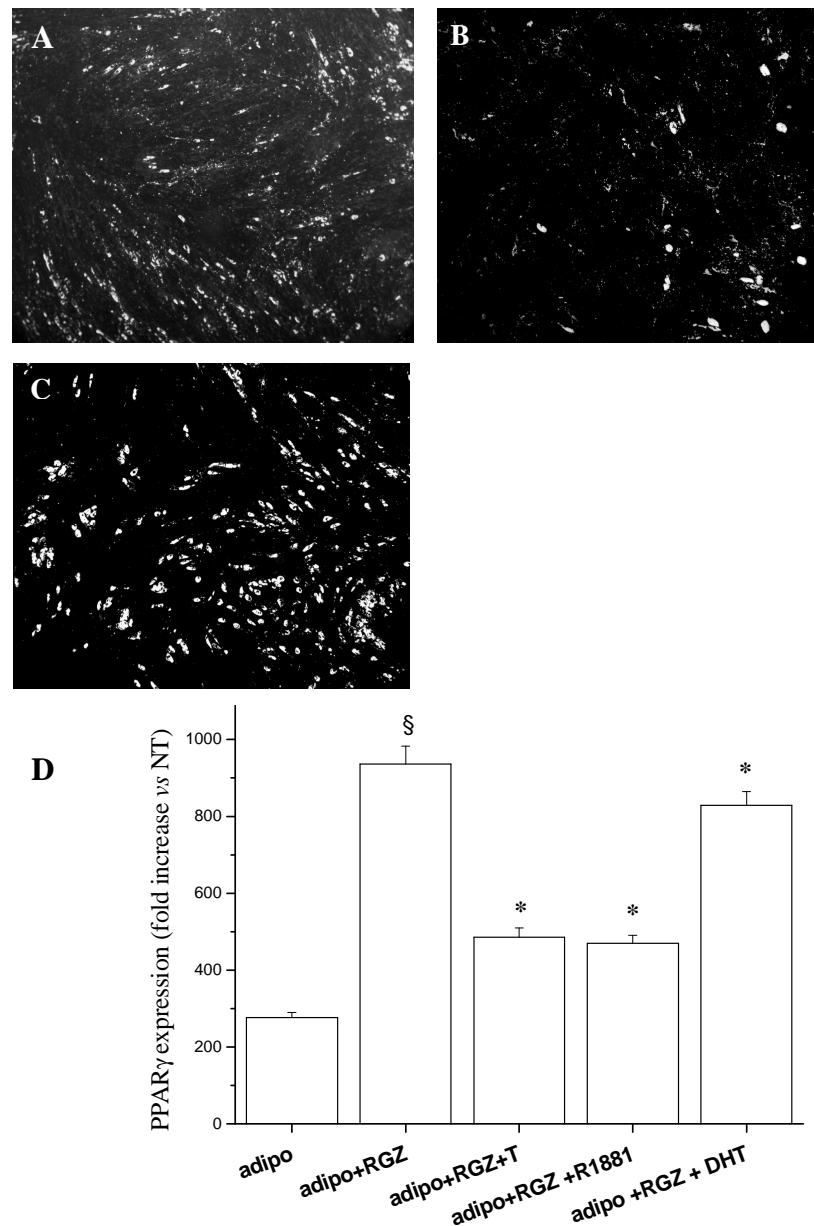


Fig 15: Gocce lipidiche all'interno delle hMSC trattate con il cocktail adipogenico con aggiunta di RGZ+T 10 nM (A); con aggiunta di RGZ+R1881 10 nM (B); con aggiunta di RGZ+DHT 10 nM (C). D: Incremento dell'espressione di PPAR γ rispetto all'espressione basale delle hMSC, considerata 1. * = $p < 0.05$ vs adipo+RGZ § = $p < 0.05$ vs adipo.

Effetto di estrogeni, androgeni e fitoestrogeni sull'osteoblastogenesi

Le hMSC sono state differenziate verso il fenotipo osteoblastico esponendo le cellule al cocktail differenziativo come riportato nella sezione materiali e metodi, per tre settimane. Il RGZ riduceva drasticamente l'espressione di osteocalcina come riportato in fig 16 A-B. Il $17\beta E_2$ (E) contrastava fortemente l'effetto inibitorio del farmaco; entrambi i fitoestrogeni G e Q aumentavano l'espressione del marker rispetto alla cellule trattate con RGZ, anche se la quantità di mRNA era inferiore al livello di controllo delle hMSC differenziate ad osteoblasti (Fig 16 A). Quando le cellule venivano trattate con androgeni, questi contrastavano in modo efficace l'effetto negativo del RGZ ed aumentavano significativamente l'espressione di osteocalcina. Rispetto ai fitoestrogeni, gli androgeni inducevano un trend all'aumento dell'espressione di osteocalcina più marcato, anche se non significativamente più elevato (fig. 16B).

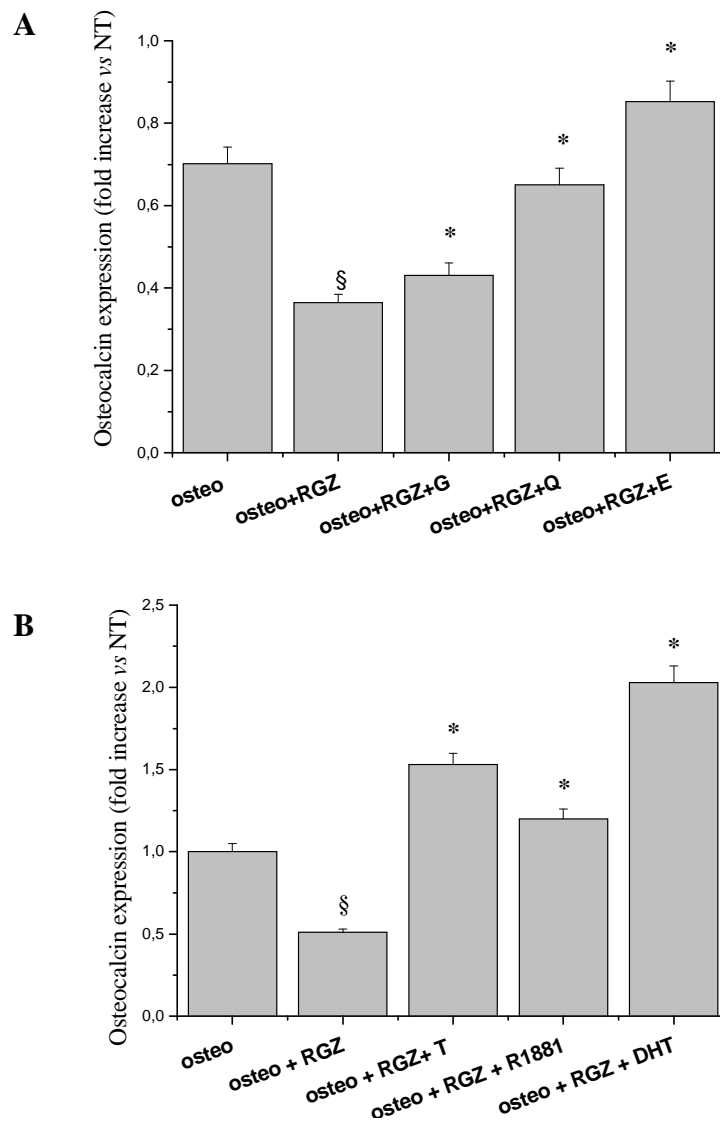


Fig 16: Incremento dell'espressione di osteocalcina rispetto all'espressione basale delle hMSC, considerata 1. A) Effetto di molecole estrogeniche B) Effetto di molecole androgeniche. * = $p < 0.05$ vs osteo+RGZ § = $p < 0.05$ vs osteo.

DISCUSSIONE

In questo studio sono state valutate azioni diverse da quelle classiche di due molecole utilizzate nella terapia del DMT2. In particolare, abbiamo studiato: 1) gli effetti di EXE sul modello di cellule neuronali umane SH-SY5Y in termini di differenziamento neuronale (valutato sulla base della formazione di prolungamenti neuritici, del rimodellamento citoscheletrico e dell'attivazione di canali specifici del fenotipo neuronale maturo) e di protezione dallo stimolo apoptotico da stress ossidativo, che è alla base del danno neuronale di molte patologie neurodegenerative; e 2) gli effetti del RGZ sul differenziamento di cellule hMSC verso le linee osteoblastica ed adipocitaria, in termini di modulazione sia dell'espressione di markers lineage-specifici che delle alterazioni strutturali e funzionali dei due fenotipi maturi: la formazione di vacuoli lipidici nel caso degli adipociti, la deposizione di matrice ossea nel caso degli osteoblasti.

Il nostro obbiettivo nella prima parte di questa serie di esperimenti è stato quello di studiare le proprietà dell'EXE in termini di differenziamento neuronale ed azioni neuroprotettive, utilizzando un modello cellulare neuronale umano (SH-SY5Y). Poiché il GLP1-R è accoppiato alla via adenilato ciclasica mediante l'attivazione di proteine Gs, abbiamo misurato i livelli intracellulari di cAMP dopo il trattamento con EXE nel nostro modello cellulare, dimostrando che il recettore è funzionalmente attivo. Le proprietà differenziative dell'EXE sono state osservate precedentemente per le cellule di feocromocitoma di ratto PC12, in cui sono state anche osservate alcune modifiche biochimiche in seguito al trattamento, tra cui l'attivazione dei pathways di PI3-kinasi ed ERK-MAP kinasi (Perry 2002). La linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y è un modello accreditato in letteratura per il differenziamento neuronale, poiché il suo

trattamento con RA determina la formazione di lunghe protrusioni neuritiche e lo sviluppo di canali ionici tipici del fenotipo neuronale differenziato (Påhlman 1984, Toselli 1991). Pertanto in questo studio abbiamo confrontato gli effetti di EXE nell'indurre l'estensione dei neuriti in cellule SH-SY5Y, utilizzando cellule trattate con RA come controllo positivo. Abbiamo trovato che EXE era in grado di indurre una differenziazione che riguardava principalmente il numero di neuriti presenti nelle cellule; al contrario, l'RA sembrava essere più efficace nell'aumentare la lunghezza dei neuriti esistenti. Le fasi iniziali della neuritogenesi sono regolate da meccanismi che prevedono la riorganizzazione di due strutture citoscheletriche: microtubuli e microfilamenti di actina (Dehmelt 2003). Dati pubblicati in letteratura hanno dimostrato che durante la neuritogenesi gli step iniziali di rapida fuoriuscita dell'abbozzo neuritico sono sensibili al veicolamento intracellulare di antisieri anti-tubulina (Shea 1994), suggerendo così che i microtubuli svolgano un ruolo importante nella morfogenesi neuronale. I nostri dati, ottenuti mediante microscopia ad immunofluorescenza, hanno dimostrato che il trattamento con EXE è efficace nell'indurre riarrangiamenti multipli del citoscheletro che determinano la formazione di protrusioni neuritiche. Analizzando l'espressione delle componenti citoscheletriche, abbiamo poi osservato che in seguito allo stimolo con EXE l'actina viene fortemente espressa e riorganizzata in fibre di stress ed in strutture simil-cono, mentre questa tendenza è meno evidente sia nel controllo che nelle cellule trattate con RA. Gli effetti osservati nelle cellule trattate con EXE o con RA potrebbe riflettere probabilmente un diverso stadio di differenziazione dei neuroni. Durante i primi stadi di neuritogenesi l'actina viene polimerizzata dai monomeri globulari di (G)-actina a generare coni di F-actina (Berneistein 1992). I nostri dati mostrano chiaramente la presenza di protrusioni ricche di actina che potrebbero rappresentare una fase iniziale di neuritogenesi. In linea con questi

risultati, le proprietà passive di membrana riguardanti la superficie cellulare, stimata misurando la capacità di membrana, hanno mostrato un aumento significativo che indica che queste protrusioni richiedono aggiunta di nuova membrana, escludendo la possibilità che i prolungamenti dipendano dalla ritrazione del soma cellulare. Inoltre, gli esperimenti di elettrofisiologia hanno confermato che l'elevato aumento della polimerizzazione di F-actina in cellule trattate con EXE era accompagnato da un forte miglioramento della sensibilità meccanica mediante l'aumento di I_{SAC} , che forniva quindi una ulteriore fonte per l'ingresso di Ca^{2+} utile per la differenziazione e per la crescita Ca^{2+} -dipendente del soma e dei neuriti (Henley 2004, D'Ascenzo 2006). Infine il trattamento con EXE migliorava anche la disponibilità di I_{Na} e $I_{Ca,T}$ voltaggio-attivati, e in misura superiore di $I_{Ca,L}$: i cambiamenti dei loro parametri di Boltzmann di attivazione ed inattivazione sono ulteriori indici di differenziamento dei neuroni verso cellule più mature. Nel complesso questi risultati suggeriscono che EXE agisce come agente promuovente la plasticità neuronale. Un ruolo del GLP-1 nella regolazione della differenziazione dei neuroni è stato recentemente osservato da Fisher e colleghi in un modello animale (2005). Questo gruppo ha ipotizzato che la neurogenesi postnatale della retina sia regolata da glucagone, GLP-1 ed insulina, in cui il primo potrebbe stimolare i progenitori della retina inducendoli alla differenziazione.

Un altro obiettivo del nostro studio era di determinare se EXE esercitasse effetti neuroprotettivi in cellule SH-SY5Y. A questo scopo, abbiamo focalizzato il nostro interesse sulla morte cellulare indotta da stress ossidativo, che svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (AD) ed è intimamente legata all'invecchiamento. Quando le cellule venivano preincubate per 24h con EXE prima dell'esposizione all' H_2O_2 si verificava un effetto neuroprotettivo della molecola, che abbiamo valutato sia

mediante metodica MTS che con saggio Trypan blue. In particolare, EXE era in grado di contrastare l'apoptosi osservata sulla base della degradazione del DNA genomico mediante metodica TUNEL. Questi dati sono in accordo con una review di Perry e Greig, che suggerisce che il GLP-1 ed i suoi analoghi possano essere considerati nuovi potenziali bersagli terapeutici per la terapia dell' AD, così come per altre condizioni neurodegenerative centrali e periferiche (Perry e Greig 2002). Complessivamente i nostri risultati hanno mostrato due proprietà associate esercitate dall'EXE alla stessa concentrazione, cioè azioni differenzianti ed anti-apoptotiche. È stato riportato che alcune sostanze che presentano un'attività promuovente la crescita neuritica *in vitro* potrebbero essere utili per il trattamento delle malattie neurodegenerative, tra cui l'AD, agendo sulla ricostruzione della rete neurale danneggiata che si osserva in queste condizioni patologiche (Gillespie 2003, O'Neill 2004, Tohda 2004). E' stato dimostrato che il citoscheletro di actina svolge un ruolo cruciale nella regolazione della risposta cellulare ai segnali di apoptosi (Rosen 2000, Posey 1999, Parlato 2000, Yang 2004). Uno dei possibili fattori chiave per spiegare sia le proprietà anti-apoptotiche che differenzianti di EXE potrebbe essere la cofilina, una proteina coinvolta nel treadmilling dell' actina (processo dinamico in cui i filamenti mantengono la loro lunghezza mediante l'aggiunta di monomeri di G-actina all'estremità + e la loro idrolisi all'estremità -) mediante la rottura delle fibre esistenti di F-actina (Ichetovkin 2002). E' stato dimostrato che la cofilina ha anche un ruolo nell'induzione di apoptosi, poichè trasloca rapidamente ai mitocondri in seguito all'esposizione ad agenti proapoptotici, permettendo così il verificarsi della morte cellulare (Chua 2003). Sia l'azione regolante il treadmilling dell'actina che la progressione del processo apoptotico sono regolate negativamente dalla fosforilazione della proteina (Arber 1998). Nel nostro studio, l'analisi western blot dello stato di fosforilazione della cofilina ha mostrato

l'inattivazione della proteina in seguito al trattamento con EXE, stato funzionale alla stabilizzazione delle fibre di stress ed all'azione anti-apoptotica attraverso l'inibizione della traslocazione mitocondriale.

Pertanto, ipotizziamo che la cofilina possa essere un mediatore sia dell'induzione della neuritogenesi che dell'azione antiapoptotica dell'EXE in cellule neuronali umane. Dal momento che la neuropatia rappresenta una delle complicanze più invalidanti del diabete, questi effetti potrebbero avere un impatto clinico nei pazienti che assumono questo farmaco. Questa ipotesi è supportata dalla presenza di studi clinici in corso, che hanno lo scopo di valutare l'effetto di exenatide nel sistema nervoso dei pazienti diabetici (NCT00855439, NCT00747968; www.clinicaltrials.gov). Inoltre, i nostri dati originali sono in accordo con precedenti osservazioni in merito ad un potenziale effetto favorevole degli analoghi del GLP-1 per il trattamento di diverse patologie a carico dei neuroni, tra cui l'AD (Perry 2002).

Per quanto riguarda lo studio sugli effetti del RGZ sull'osso, nel presente studio abbiamo utilizzato un modello di cellule staminali mesenchimali umane di midollo osseo (hMSC), cellule che fisiologicamente hanno il ruolo di progenitore comune di diversi tipi cellulari maturi tra cui osteoblasti ed adipociti (Prockop 1997). In questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta che un agonista di PPAR- γ induce la differenziazione delle cellule hMSC verso la linea adipocitaria, impedendo il commissionamento in senso osteoblastico. Questa osservazione è in accordo con uno studio del 2004 in cui si osservava un incremento di massa ossea in topi PPAR- γ difettivi, dovuto ad un aumento del numero degli osteoblasti (Akune 2004) e con il fatto che l'espressione di PPAR- γ aumenta durante l'invecchiamento, mentre si assiste ad una parallela diminuzione di espressione di Runt-related transcription factor 2 (Runx2), un marker precoce del

differenziamento osteoblastico (Moerman 2004, Schroeder 2005). Pertanto, l'attivazione di PPAR γ sembra avere un effetto negativo sull'osteoblastogenesi, che può essere dovuto, almeno in parte, agli effetti proapoptotici dei TZD osservati su osteoblasti ed osteociti (Sorocéanu 2004). Va sottolineato che le concentrazioni utilizzate nel presente studio sono facilmente raggiungibili nei tessuti dei pazienti trattati con RGZ a dosi terapeutiche (2-4 mg). In una fase successiva dello studio, il nostro scopo è stato comprendere dal punto di vista cellulare e molecolare l'osservazione clinica che solo le donne in post-menopausa vengano colpite da osteopenia indotta da TZD, mentre le donne in premenopausa e gli uomini non risultano interessati dalla patologia. Il ruolo fondamentale degli ormoni sessuali sul rimodellamento osseo è ben noto. La perdita della funzione ovarica in menopausa rappresenta il fattore più importante per lo sviluppo di osteoporosi, la malattia metabolica ossea che colpisce in tutto il mondo milioni di persone e contribuisce notevolmente alla morbidità ed alla mortalità tra le donne anziane. La perdita di androgeni nei maschi dovuta a castrazione chimica o chirurgica o il declino dei livelli di androgeni associato all'età - anche se più sfumato e graduale rispetto alla menopausa - ha lo stesso effetto negativo sull'osso (Manolagas 2002). In seguito alla perdita di steroidi sessuali, gli osteoclasti erodono più in profondità rispetto alla cavità normale, il che porta alla rimozione degli elementi spongiosi ed alla perdita di connessione tra quelli rimanenti (Manolagas 2002). Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla rimozione di effetti pro-apoptotici degli estrogeni sugli osteoclasti (Manolagas 2002). In modelli murini, l'ovariectomia o l'orchiectomia provocano un significativo aumento della prevalenza di apoptosi di osteoblasti ed osteociti. L'aggiunta di estrogeni o androgeni sopprime l'apoptosi di entrambi i tipi cellulari indotta da una varietà di stimoli pro-apoptotici in vitro (Manolagas 2002). Oltre agli effetti sulle cellule differenziate, in letteratura sono presenti

alcuni dati che riguardano l'effetto degli ormoni sessuali sul differenziamento delle cellule staminali del midollo osseo in modelli animali. E' stato suggerito che nei soggetti anziani con osteoporosi la compromissione della formazione ossea sia associata ad un accumulo di tessuto adiposo all'interno della cavità del midollo. Da qui si è fatta strada l'idea che ci possa essere una regolamentazione reciproca di osteoblastogenesi ed adipogenesi (Nuttall 2000). Su un modello di cellule staminali stromali di midollo osseo murino, è stato dimostrato che gli estrogeni modulano il processo di differenziamento di queste cellule verso le linee osteoblastica ed adipocitaria causandone uno spostamento verso la linea degli osteoblasti. In questo studio si ipotizzava quindi che l'effetto protettivo degli estrogeni sul tessuto osseo possa essere in parte mediato dal potenziamento della formazione dell'osso, oltre che dall'inibizione del riassorbimento osseo da parte dagli osteoclasti (Okazaki 2002). Inoltre, nei roditori è stato dimostrato che il testosterone può contrastare la differenziazione dei progenitori mesenchimali pluripotenti verso il fenotipo adipogenico (Singh 2003). Nel nostro studio, dopo aver dimostrato che le cellule hMSC esprimono i recettori estrogenici α e β ed il recettore androgenico, alle cellule trattate con RGZ abbiamo aggiunto diversi tipi di molecole estrogeniche: estrogeni naturali (17β -estradiolo, $17\beta E_2$, G e Q) ed androgeni naturali aromatizzabili (T) e non aromatizzabili (DHT) e un androgeno sintetico non aromatizzabile (R1881). La valutazione di entrambi i tipi di androgeni mirava a valutare se l'eventuale effetto osservato dipendesse dalla quota di androgeno convertito ad estrogeno dall'enzima aromatasi citocromo P450, espresso dalle hMSC (Heim 2004), dall'androgeno di per sé, o da entrambi. E' stato infatti dimostrato che l'attività dell'aromatasi nelle hMSC aumenta quando queste vengono stimulate a differenziare verso la linea osteoblastica (Pino 2006). G e Q sono sostanze di origine vegetale identificate in molte piante anche presenti nella dieta umana e che hanno proprietà ormonali di tipo

estrogenico. In particolare, è stato dimostrato che G favorisce il commissionamento delle hMSC in senso osteoblastico (Heim 2004).

T, DHT ed R1881 sono risultati efficaci nel contrastare l'effetto di RGZ sull'adipogenesi nonostante l'effetto del DHT fosse quantitativamente meno rilevante; l'inibizione avveniva sia in termini di numero di cellule contenenti gocce lipidiche, che in termini di espressione del marker di differenziamento adipocitario PPAR γ . Per quanto riguarda le molecole estrogeniche, mentre il 17 β E $_2$ inibiva significativamente l'effetto del RGZ, i fitoestrogeni non erano in grado di ridurre l'efficacia. Sia il 17 β E $_2$ che i fitoestrogeni contrastavano l'effetto del TZD sull'inibizione dell'osteoblastogenesi così come gli androgeni aromatizzabili e non aromatizzabili, come si osserva sia dalla riduzione della comparsa di gocce lipidiche che dall'aumentata espressione del marker osteoblastico osteocalcina. E' interessante notare che gli effetti degli androgeni in confronto a quelli degli estrogeni sembravano però quantitativamente più rilevanti; mentre gli androgeni portavano l'espressione di osteocalcina ad un livello superiore a quello delle cellule trattate con il solo cocktail osteogenico, gli estrogeni ne aumentavano l'espressione in modo meno evidente, anche se significativo.

In conclusione gli effetti del RGZ sulla differenziazione delle cellule staminali forniscono un meccanismo razionale che potrebbe essere responsabile degli effetti del farmaco osservati sulla densità ossea (Schwartz 2006, Grey 2007) e sulle fratture ossee (Kahn 2006). E' possibile che il ridotto numero di osteoblasti differenziati, conseguenza del trattamento con TZD, possa determinare una riduzione della deposizione di matrice ossea, con conseguente riduzione della densità ossea. I nostri risultati hanno dimostrato chiaramente che gli ormoni androgenici T, DHT, ed R1881 ed il 17 β E $_2$ contrastano efficacemente l'effetto

osteopenizzante del RGZ rispostando l'equilibrio della spinta differenziativa delle cellule staminali del midollo osseo in senso osteoblastico. La protezione degli androgeni è risultata dipendere sia dalla componente aromatizzabile di T che dalla componente non aromatizzabile. Non si osservava alcun effetto dei fitoestrogeni sull'adipogenesi, mentre è stato chiaramente dimostrato un effetto dei fitoestrogeni sull'osteoblastogenesi paragonabile a quello del $17\beta E_2$, il che fornisce un razionale indiretto per la sperimentazione sull'utilizzo della genisteina per il trattamento dell'osteoporosi postmenopausale. L'utilizzo dei fitoestrogeni nel contrastare l'osteopenia nelle donne diabetiche avrebbe il vantaggio di una ridotta probabilità di effetti collaterali rispetto al $17\beta E_2$, aprendo la prospettiva per lo sviluppo di nuovi farmaci più sicuri; a conferma di questa ipotesi un articolo pubblicato alla fine del 2008 ha dimostrato che il trattamento con genisteina per tre anni in donne in post-menopausa incrementa i markers di formazione ossea quali osteoprotegerina e fosfatasi alcalina, mentre non ha effetto sulla densità mammaria o sullo spessore endometriale (Marini 2008). Inoltre, è attualmente in fase di reclutamento un trial clinico sull'effetto della genisteina su donne in post-menopausa con e senza sindrome metabolica (www.clinicaltrials.gov, NCT00541710).

In conclusione, il nostro studio ha evidenziato effetti importanti di due molecole ipoglicemicizzanti, ampiamente utilizzate nella terapia del DMT2, su tipi cellulari appartenenti a distretti diversi da quelli classicamente considerati bersaglio. Queste azioni "collaterali" devono essere attentamente valutate non solo per evitare che potenziali effetti negativi si sommino alle complicazioni della patologia, ma anche perché, qualora esse risultassero benefiche, possano aprire nuove prospettive sulla loro applicazione terapeutica a condizioni patologiche diverse.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, et al. 2005 The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3–36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res* 1044:127–131
- 2 Abemayor E, Sidell N 1989 Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health Perspect* 80:3–15
- 3 Ahmed LA, Joakimsen RM, Berntsen GK, et al. 2006 Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: the Tromso study. *Osteoporos Int*; 17: 495–500.
- 4 Ahren B 2004 GLP-1 and Extra-islet Effects. *Horm Metab Res* 36: 842–845
- 5 Akune T, Ohba S, Kamekura S, et al. 2004 PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *Journal of Clinical Investigation*;113(6):846–855.
- 6 Aldhahi W, Hamdy O. 2003 Adipokines, inflammation and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep*;3:293–8
- 7 Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, et al. 2005 Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*.146(3):1226–1235
- 8 Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, et al. 2008 Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*; 17:909–916
- 9 Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. 1998 Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805–809
- 10 Axelsen M, Smith U, Eriksson JW et al. 1999 Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med*;131:27–31.
- 11 Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, et al. 2004 Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology* 127:546–558
- 12 Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N* 1996 *Engl J Med*;334:574–9
- 13 Benvenuti S, Luciani P, Vannelli GB, et al. 2005 Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1775–1782
- 14 Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, et al. 2006 Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res* 312:2592–2604
- 15 Benvenuti S, Cellai I, Luciani P et al., 2007 Rosiglitazone stimulates adipogenesis and

- decreases osteoblastogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Endocrinol Invest.* 30: RC26–30.
- 16 Berberoglu Z, GURSOY A, Bayraktar N, et al. 2007 Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. *J Clin Endocrinol Metab*; 92:3523–3530. Links
 - 17 Bergman RN, Ader M. 2000 Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*; 11:351–356.
 - 18 Bernestein BW, Bamburg JR 1992 Actin in emerging neurites is recruited from a monomer pool. *Mol Neurobiol* 6:95–106
 - 19 Biswas SC, Buteau J, Greene 2008 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) diminishes neuronal degeneration and death caused by NGF deprivation by suppressing Bim induction. *LA.Neurochem Res*; 33(9):1845–51.
 - 20 Bonds DE, Larson JC, Schwartz AV et al. 2006 Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 3404–3410. Links
 - 21 Chan BY, Gartland A, Wilson PJM et al. 2007 PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. *Bone*; 40: 149–159. Links
 - 22 Chiao E, Kmet M, Behr B, et al 2008 Derivation of Human Embryonic Stem Cells in Standard and Chemically Defined Conditions. *Methods Cell Biol*; 86:1–14.
 - 23 Chua BT, Volbracht C, Tan KO, et al. 2003 Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol* 5:1083–1089
 - 24 Cock T-A, Back J, Eleftheriou F, et al. 2004 Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR α (hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Reports*.5(10): 1007–1012.
 - 25 D'Ascenzo M, Piacentini R, Casalbore P, et al. 2006 Role of L-type Ca²⁺ channels in neural stem \rightarrow progenitor cell differentiation. *Eur J Neurosci* 23:935–944
 - 26 Dachicourt N, Serradas P, Bailbe D, et al. 1997 Glucagon-like peptide-1(7–36)-amide confers glucose sensitivity to previously glucose-incompetent beta-cells in diabetic rats: in vivo and in vitro studies. *J Endocrinol*;155:369–76
 - 27 Davidson JA, Parente EB, Gross JL. 2008 Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: innovative treatment therapies for type 2 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* ;52(6):1039–49.
 - 28 Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, et al. 1995. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*. 44:1126–31.
 - 29 Deacon CF. 2004 Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes*; 53:2181–9.
 - 30 Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS et al. 2003 The role of microtubule-associated protein

- 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci* 23:9479-9490
- 31 Diascro DD, Vogel RL, Johnson TE et al. 1998 High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res*; 13: 96–106. Links
 - 32 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-7.
 - 33 Drucker DJ, Nauck MA. 2006; The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 368:1696-705
 - 34 Drucker DJ. 2006 The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*. 3:153-65
 - 35 During MJ, Cao L, Zuzga DS, et al. 2003 Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9:1173-1179
 - 36 Einhorn D, Aroda VR, Henry RR 2004 Glitazones and the management of insulin resistance: what they do and how might they be used. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33:595–616, vii-viii Eng J. Exendin peptides *Mt Sinai J Med*. 1992 Mar;59(2):147-9.
 - 37 Erceg S, Láinez S, Ronaghi M, et al. 2008 Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Regional Specific Neural Precursors in Chemically Defined Medium Conditions. *PLoS ONE*; 3(5):e2122
 - 38 Fagan TC, Deedwania PC. 1998 The cardiovascular dysmetabolic syndrome. *Am J Med*.105:77S-82S.
 - 39 Farilla L, Hui H, Bertolotto C, et al. 2002; Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*. 143:4397-408.
 - 40 Ferrannini E. 1998; Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*. 19:477-490.
 - 41 Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, et al. 2001; Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats: rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 50(5):1021-9.
 - 42 Fischer AJ, Omar G, Walton NA et al. 2005 Glucagon-Expressing Neurons within the Retina Regulate the Proliferation of Neural Progenitors in the Circumferential Marginal Zone of the Avian Eye. *J Neurosci*, 25:10157-10166
 - 43 Formigli L, Francini F, Tani A, et al. 2005 Morphofunctional integration between skeletal myoblasts and adult cardiomyocytes in coculture is favored by direct cell-cell contacts and relaxin treatment. *Am. J Physiol Cell Physiol* 288:795-804
 - 44 Formigli L, Sassoli C, Squecco R, et al. 2009 Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* 122:1322-1333

- 45 Galli A, Mello T, Ceni E, et al 2006 The potential of antidiabetic thiazolidinediones for anticancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 15: 1039-49.
- 46 Garraway WM, Stauffer RN, Kurland LT et al. 1979 Limb fractures in a defined population. I. Frequency and distribution. *Mayo Clin Proc*; 54: 701-707.
- 47 Gillespie LN 2003 Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:724-733
- 48 Gimble JM, Robinson CE, Wu X et al. 1996 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol*; 50: 1087-1094. [Links](#)
- 49 Glintborg D, Andersen M, Hagen C, et al. 2008 Association of pioglitazone treatment with decreased bone mineral density in obese premenopausal patients with polycystic ovary syndrome: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 1696-1701. [Links](#)
- 50 Goke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, et al. 1995 Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci* 7:2294-2300
- 51 Grey A 2009 Thiazolidinedione-induced skeletal fragility – mechanisms and implications. *Diabetes obese Metab* 11(4):275-84.
- 52 Grey A, Bolland M, Gamble G, et al. 2007, The peroxisome proliferators-activated receptor- γ agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1305-10.
- 53 Hatorpe V. 2002 Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide. *Clin Pharmacokinet*; 41:471-83.
- 54 Heim M, Frank O, Kampmann G, et al. 2004 The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 145 848-859.
- 55 Henley J, Poo MM 2004 Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends Cell Biol* 14:320-330
- 56 Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW 1999; Chronic activation of 5'-AMPactivated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* 87:1990-5
- 57 Holst JJ, Gromada J. 2004 Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;287:E199-E206.
- 58 Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J 2002 Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 12:79-84

- 59 Ishikawa M, Pruneda ML, Adams-Huet B, et al. 1998 Obesity-independent hyperinsulinemia in nondiabetic first-degree relatives of individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*. 47:788-792.
- 60 Jackson SM, Demer LL. 2000; Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *FEBS Lett* 471: 119–124. [Links](#)
- 61 Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, et al. 2007 Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15069–15074
- 62 Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al. 2007 Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*; 166: 495–505. [Links](#)
- 63 Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH et al. 2003 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem*; 278: 23270–23277. [Links](#)
- 64 Jin SL, Han VK, Simmons JG, 1988 Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 271: 519-532.
- 65 Johnson TE, Vogel R, Rutledge SJ, et al. 1999 Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology*; 140: 3245–3254. [Links](#)
- 66 Kahn SE, Haffner SM, Heise MA et al. 2006 Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med*; 355: 2427–2443. [Links](#)
- 67 Khan E, Abu-Amer Y. 2003 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med*; 142: 29–34. [Links](#)
- 68 Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*.;136:3585-96
- 69 Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. 2002 Metformin: an update. *Ann Intern Med*;137:25-33.
- 70 Lebovitz HE. 1997 Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am*;26:539-51
- 71 Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ et al. 1999 Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem*; 74: 357–371. [Links](#)
- 72 Li Y, Perry T, Kindy MS, et al. 2009 GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1285–1290
- 73 Lillioja S, Mott DM, Spraul M, et al. 1993 Insulin resistance and insulin secretory

- dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus: prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*;329:1988-1992.
- 74 Lister CA, Moore GBT, Piercy V, et al. Rosiglitazone, but not metformin or glibenclamide, improves glycaemic control and increases islet insulin content. *Diabetologia* 1999;42(suppl 1):A150
 - 75 Luciani P, Ferruzzi P, Arnaldi G, et al. 2004 Expression of the novel adrenocorticotropin-responsive gene selective Alzheimer's disease indicator-1 in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1332-1339
 - 76 Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL 2002 Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57:385-409.
 - 77 Marini H, Bitto A, Altavilla D et al., 2008 Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(12):4787-96.
 - 78 Martinez-Monedero R, Yi E, Oshima K, et al. 2008 Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Dev Neurobiol*; 68:669-684
 - 79 Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A et al. 2000 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*; 275: 14388-14393. Links
 - 80 McLeod JF. 2004 Clinical pharmacokinetics of nateglinide. *Clin Pharmacokinet*;43:97-120
 - 81 Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, et al. 1999 Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 140:244-250
 - 82 Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M et al. 2008 Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med*; 168: 820-825. Links
 - 83 Moens K, Heimberg H, Flamez D, et al.1996 Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulintropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* 45: 257-261
 - 84 Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, et al. 2004 Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPARgamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signalling pathways. *Aging Cell*, 3: 379-89.
 - 85 Monami M, Cresci B, Colombini A et al. 2008 Bone fractures and hypoglycemic treatment in type 2 diabetic patients: a case-control study. *Diabetes Care*; 31: 199-203.
 - 86 Näslund E, Barkeling B, King N, et al. 1999 Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 304-311.

- 87 Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. 1993 Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*;91:301-7
- 88 Neumiller JJ 2003. Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc* 2009 Sep-Oct;49 Suppl 1:S16-29. Review.
- 89 Nicodemus KK, Folsom AR 2001 Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care*; 24: 1192–1197.
- 90 Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K et al. 2008 Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *JAMA*; 299: 1561–1573. Links
- 91 Nuttall ME, Gimble JM 2000 Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* 27:177–184
- 92 Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, 1998 Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*; 13: 371–382. Links
- 93 O'Neill K, Chen S, and Brinton RD 2004 Impact of the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, on neuronal survival and outgrowth following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 185:63-80
- 94 Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M et al. 2002 Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*; 143(6):2349-56.
- 95 Okazaki R, Miura M, Toriumi M, et al. 1999 Short-term treatment with troglitazone decreases bone turnover in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 46:795–801
- 96 Orskov C, Poulsen SS, Møller M, et al. 1996 Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes*; 45(6):832-5.
- 97 Pålman S, Ruusala AI, Abrahamsson L et al 1984 Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 14(2):135-44.
- 98 Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, et al. 2000 CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J* 19:5123-5134
- 99 Perry T, Greig NH 2002 The glucagon-like peptides: a new genre in therapeutic targets for intervention in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4:487-496
- 100 Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, et al. 2002 Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 302:881-888

- 101 Perry T, Holloway HW, Weerasuriya A, et al. 2007 Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp Neurol* ;203(2):293-301.
- 102 Perry T, Lahiri DK, Chen D, et al. 2002 A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 300:958-966
- 103 Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, et al. 2003 Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res* 72:603-12
- 104 Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, et al. 1997 Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* ;46:1001-1009.
- 105 Pino AM, Rodriguez JM, Rios S, et al. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin *J Endocrinol*. 2006 Dec;191(3):715-25.
- 106 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. et al. 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-47
- 107 Posey SC, Bierer BE 1999 Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. *J Biol Chem* 274:4259-4265
- 108 Prockop DJ 1997 Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74
- 109 Randle PJ, Garland PB, Hales CN, et al. 1963 The glucose fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*.1:785-789.
- 110 Rizos CV, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP et al, 2008 Pleiotropic effects of thiazolidinediones. *Expert Opin Pharmacother*. 9 :1087-108.
- 111 Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*; 97:2859-2865.
- 112 Rosen K, Rak J, Leung T, et al. 2000 Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 149:447-456
- 113 Rosenstock J, Rood J, Cobitz A, et al. 2006 Initial treatment with rosiglitazone/metformin fixed-dose combination therapy compared with monotherapy with either rosiglitazone or metformin in patients with uncontrolled type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 8:650-660.
- 114 Rother, KI 2007. Diabetes Treatment — Bridging the Divide. *N Engl J Med* 356 (15): 1499-1501. doi:10.1056/NEJMp078030.
- 115 Rubin GL, Zhao Y, Kalus AM, et al. 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor ligands inhibit estrogen biosynthesis in human breast adipose tissue: possible implications for breast cancer therapy. *Cancer Res* 60:1604-1608

- 116Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, et al. 2004 Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* 145:401–406
- 117Sanders KM, Seeman E, Ugoni AM et al. 1999 Age- and gender-specific rate of fractures in Australia: a population-based study. *Osteoporos Int*; 10: 240–247. Links
- 118Sbrana F, Sassoli C, Meacci E, et al. 2008 Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*; 295:C160-172
- 119Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W. 1985 Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*; 28(9):704-7.
- 120Schroeder TM, Jensen ED, and Westendorf JJ 2005 Runx2: A Master Organizer of Gene Transcription in Developing and Maturing Osteoblasts *Birth Defects Research (Part C)* 75:213–225
- 121Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE et al. 2001 Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 32–38.
- 122Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, et al. 2006 Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3349-54.
- 123Shea TB, Beermann ML 1994 Respective roles of neurofilaments, microtubules, MAP1B, and Tau in neurite outgrowth and stabilization. *Mol Biol Cell* 5:863-875
- 124Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. 2003 Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*,144: 5081-8.
- 125Soroceanu MA, Miao D, Bai XY, et al. 2004 Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol* 183:203–216
- 126Sottile V, Seuwen K, Kneissel M 2004 Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPAR agonist BRL49653 (rosiglitazone). *Calcif Tissue Int* 75:329–337
- 127Stern M. 1999 Natural history of macrovascular disease in type 2 diabetes: role of insulin resistance. *Diabetes Care*.;22(suppl 3):C2-C5.
- 128Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, et al. 1996 Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* 271: R848-R856
- 129Thorens B 1992 Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucorecretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8641-8645
- 130Thorens B, Porret A, Bühler L, et al. 1993 Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*. ;42(11):1678-82.
- 131Tierney M, S J McPhee, M A Papadakis (2002). *Current medical Diagnosis & Treatment*. International edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill. pp.

1203–15.

- 132 Tohda C, Matsumoto N, Zou K, et al. 2004 Abeta(25–35)- induced memory impairment, axonal atrophy and synaptic loss are ameliorated by M1, a metabolite of protopanaxadiol-type saponins. *Neuropsychopharmacology* 29:860–868
- 133 Tornvig L, Mosekilde LI, Justesen J, et al. 2001 Troglitazone treatment increases bone marrow adipose tissue volume but does not affect trabecular bone volume in mice. *Calcif Tissue Int* 69:46–50
- 134 Toselli M, Masetto S, Rossi P, et al. 1991 Characterization of a Voltage-dependent Calcium Current in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During Differentiation. *Eur J Neurosci.* 3(6):514–522.
- 135 Turton MD, O'Shea D, Gunn I, et al. 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69–72
- 136 Ugleholdt R, Zhu X, Deacon CF, et al. 2004 Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology* 145:1349–1355
- 137 US Food and Drug Administration. Available from URL: http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Avandia_GSK_Ltr.pdf. Accessed 14 April 2008.
- 138 US Food and Drug Administration. Available from URL: <http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Actosmar0807.pdf>. Accessed 15 April 2008.
- 139 Usdin TB, Mezey E, Button DC, et al. 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861–2870
- 140 Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. 2005 Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*; 48: 1292–1299.
- 141 Vestergaard P. 2007 Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis. *Osteoporos Int*; 18: 427–444.
- 142 Wei Y, Mojsov S 1995 Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett* 358:219–224
- 143 Weyer C, Hanson RL, Tataranni PA, et al. 2000 A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia. *Diabetes*;49:2094–2101.
- 144 Wysowski DK, Armstrong G, Governale L 2003 Rapid increase in the use of oral antidiabetic drugs in the United States, 1990–2001. *Diabetes Care* 26:1852–1855
- 145 Yang EJ, Yoon JH, Min DS, et al. 2004 LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized

- hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 279:8903-8910
- 146 Yaturu S, Bryant B, Jain SK. 2007 Thiazolidinediones treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care*; 30: 1574–1576.
- 147 Yki-Jarvinen H 2004 Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351:1106–1118
- 148 Yki-Jarvinen H. 1997 Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism: implications for the development of new therapies. *Diabet Med.*;14(suppl 3):S32-S37.
- 149 Zander M, Madsbad S, Madsen JL, et al. 2002 Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 359:824–30
- 150 Zhou G, Myers R, Li Y, et al. 2001 Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*;108(8):1167-74.